

B4



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Publication number:

**0 358 940
A1**

12

EUROPEAN PATENT APPLICATION

21 Application number: 89114832.6

22 Date of filing: 08.08.89

51 Int. Cl.5: C12N 15/60 , C07H 21/04 ,
C12N 1/20 , C12N 9/88 ,
C12P 13/04 , C12P 13/08 ,
C12P 13/12 , C12P 13/06 ,
C12P 13/14 , C12P 13/24 ,
C12P 13/10 , //(C12N1/20,
C12R1:15),(C12N1/20,
C12R1:13)

30 Priority: 12.09.88 GB 8821319

43 Date of publication of application:
21.03.90 Bulletin 90/12

64 Designated Contracting States:
BE DE ES FR GB IT NL SE

71 Applicant: Degussa Aktiengesellschaft
Weissfrauenstrasse 9
D-6000 Frankfurt am Main 1(DE)

72 Inventor: Bachmann, Bernd, Dr.
Meyerfeld 10a
D-4806 Werther(DE)
Inventor: Thierbach, Georg, Dr.
Gunststrasse 21
D-4800 Bielefeld 1(DE)
Inventor: Kallnowski, Jörn

Drögestrasse 25

D-4800 Bielefeld(DE)

Inventor: Pühler, Alfred, Prof. Dr.

Am Waldschlösschen 2

D-4800 Bielefeld 15(DE)

Inventor: O'Reagan, Mike

3 rue de Schaffhouse

F-67000 Strasbourg(FR)

Inventor: Viret, Jean Francois

26 rue des Muguets

F-67380 Lingolsheim(FR)

Inventor: Lepage, Pierre

1 rue de la Division Leclerc

F-67000 Strasbourg(FR)

Inventor: Lemoine, Yves

4 rue des Allisiers

F-67000 Strasbourg-Neudorf(FR)

54 DNA fragment coding for phosphoenolpyruvate carboxylase, recombinant DNA carrying said fragment, strains carrying the recombinant DNA and method for producing L-amino acids using said strains.

EP 0 358 940 A1

57 The invention relates to a DNA fragment coding for phosphoenolpyruvate carboxylase, recombinant DNA carrying said fragment, strains of the genus Corynebacterium or Brevibacterium carrying the recombinant DNA and method for producing L-amino acids using said strains.

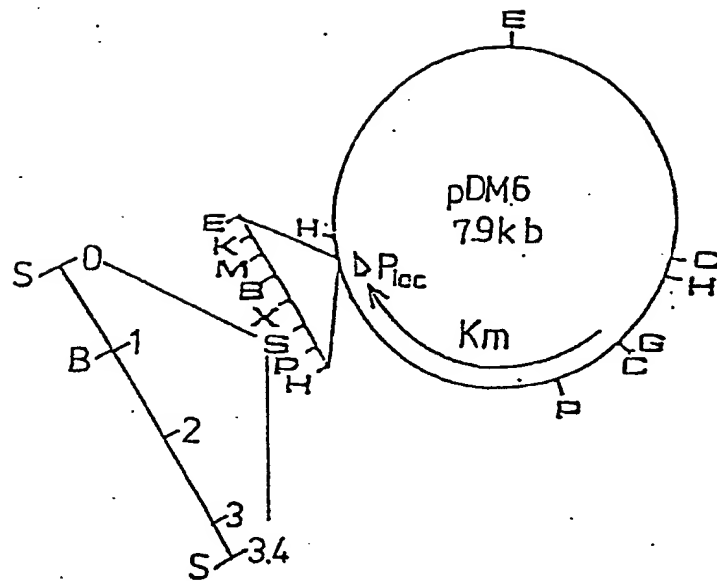


Figure 7: Restriction map of pDM6. See figure 6 for legends to symbols.

DNA FRAGMENT

Background of Invention

Field of Invention

5

The present invention relates to a DNA fragment isolated from a *C. glutamicum* strain coding for PEPC and to recombinant DNA carrying said fragment, strains carrying the recombinant DNA and to the method for producing L-amino acids using said strains.

10

Description of the Prior Art:

The enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.3.1 ; PEPC) is of particular interest in the metabolism of amino acids, since it is involved in a so-called anaplerotic function, which ensures a constant supply of oxaloacetate to the cell.

Oxaloacetate in turn occupies a central position in the metabolism of amino acids, both as the immediate precursor of L-aspartate and as a member of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Indeed, amino acids such as L-lysine, L-methionine, L-threonine and L-isoleucine derive from L-aspartate in a series of branched and highly interregulated biosynthetic pathways, whereas amino acids such as L-glutamate, L-glutamine, L-proline, L-arginine, L-citrulline, L-ornithine etc. derive from intermediates of the TCA cycle.

Thus, PEPC activity is implicated in the biosynthesis of all the amino acids hereabove mentioned.

It is apparent from the above considerations that the biosynthetic levels of amino acids, such as L-lysine, might vary depending on the intra-cytoplasmic specific activities of enzymes such as PEPC.

Considering the important role played by PEPC in the biosynthesis of amino acids, it has always been desirable to try to provide improved means for the production of amino acids by increasing the activity of PEPC.

For example, European Patent Application EP-A-0143195 discloses the cloning of the *ppc* gene isolated from *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 and the transformation of bacteria of the genera *Corynebacterium* with a recombinant plasmid, carrying said gene in order to produce L-lysine or threonine.

The prior art has also described *Corynebacterium melassecola* strains transformed with a recombinant plasmid DNA carrying the *ppc* gene of *C. melassecola*.

These strains show an increased PEPC activity, but no evidence is provided for an increase of amino acid production (FR-A-2581653).

There is no suggestion in these publications to enhance the fermentative production of amino acids, especially L-lysine, by cloning the *ppc* gene isolated from *Corynebacterium glutamicum*.

Summary of the Invention:

The inventors have discovered that, when introducing the genetic information coding for PEPC into an appropriate vehicle capable of replicating in *Corynebacteria* or *Brevibacteria*, and the resulting hybrid vehicle carrying said genetic information is replicated in an appropriate *Corynebacterium* or *Brevibacterium* host or recipient, the transformed microorganism is an excellent producer of L-amino acids, especially L-lysine.

This invention is of particular interest since many strains of *Brevibacterium* and *Corynebacterium* genera producing high amounts of L-amino acids can be utilized as hosts.

The invention thus relates to a process for the fermentative production of L-amino acids and to the various genetic and microbiological elements involved in said process. For example, the invention relates to the isolated form of the gene for PEPC, to various vehicles containing said gene, which vehicles are replicable in above mentioned bacteria, to various microbes of said microorganisms containing such vehicles, and to various fermentation processes for the production of L-amino acids.

Description of the Preferred Embodiments:

The present invention relates to a DNA fragment isolated from a *C.glutamicum* strain containing a genetic sequence comprising information coding for the production of a protein having the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC).

The donor may be one which is either mutated in ppc gene, or which is wild type in ppc gene.

- 5 The DNA fragment consists essentially of 3422 base pairs, is flanked at its termini by Sal I restriction sites and is coding for the production of PEPC, which shows the N-terminal amino acid sequence Thr¹ - Asp - Phe - Leu - Arg⁵ - Asp - Asp - Ile - - Arg - Phe¹⁰ - Leu - Gly - Gln - Ile - Leu¹⁵.

The structural gene coding for PEPC consists of 2757 base pairs.

The PEPC of interest is not stimulated by acetyl CoA.

- 10 A recombinant DNA containing a DNA fragment consisting of the ppc gene can be constructed according to conventional methods for example, by digesting chromosomal DNA and vector plasmid with a restriction enzyme, followed by treatment with a DNA ligase or by digesting chromosomal DNA and vector plasmid with a restriction enzyme, followed by treatment of cleaved terminals with terminal transferase, DNA polymerase, etc., and successive treatment with a DNA ligase, etc. (Methods in Enzymology 68 (1979)).

- 15 To isolate the ppc gene, a genomic bank of *C.glutamicum* ATCC 13032 was constructed in the plasmid pUC18, a vector commonly used for cloning in the gram negative bacterium *E. coli*. The ppc gene was isolated by complementation of known *E. coli* mutant strains affected in the corresponding genes. Candidates clones were analysed and shown both genetically and enzymatically to bear inserts containing the sought after gene.

- 20 The ppc gene was later subcloned onto so-called plasmid shuttle vectors (vehicles) allowing its propagation in both *E. coli* and the original *Corynebacterium* host, or any type of glutamate producing strain, in order to provide a recombinant DNA molecule containing the new DNA fragment inserted in a vector capable of replication in a glutamate producing strain.

Of particular interest are the vectors pZ1 and pCV 22.

- 25 Plasmid pZ1 comprises a drive unit region capable of propagating in *Coryneform* glutamic acid producing bacteria and *E.coli*, and having at least a region to express resistance to a drug.

pZ1 is disclosed in the German Patent Application 37 37 729.9.

pCV 22 is an essentially pure plasmid, which is characterized by a length of 4.5 kb and a restriction endonuclease cleavage chart shown in Figure 6.

- 30 The vectors can be obtained from the cells of microorganisms on deposit, by lysing the cells according to the state of art.

The recombinant DNA containing the ppc gene of wild type or mutant type can be introduced into microorganisms preferred of the genus *Corynebacterium* or *Brevibacterium* by known transformation methods.

- 35 Vehicles capable of replication in said microorganisms are the plasmids pDM 2 or pDM 6 (restriction maps shown in Figure 5 and 7).

C.glutamicum, *C.melassecola*, *B.lactofermentum* and *B.flavum* are preferred as recipients or hosts, especially bacteria already known for the production of amino acids.

- 40 For the expression of the ppc gene in the transformed strains, any promoter known as efficient in *Corynebacterium* or *Brevibacterium* can be used. They may be endogenous promoters of these strains, that is promoters controlling the expression of genes originally belonging to the strain. They may also be exogenous promoters, among which the promoter ptac, plac, ptrp, P_A and P_L of phage λ, can be mentioned.

- 45 A further object of the invention is a process for the production of an amino acid selected especially from the group L-lysine, L-methionine, L-threonine, L-isoleucine, L-glutamate, L-glutamine, L-proline, L-arginine, L-citrulline and L-ornithine especially L-lysine.

The methods of culturing the L-amino acid producing strains thus obtained are conventional, and are similar to the methods for the cultivation of known L-amino acids producing microorganisms.

- 50 The culture medium employed can be a conventional medium containing carbon sources, nitrogen sources, and organic ions and, when required, minor organic nutrients such as vitamins and amino acids. Examples of suitable carbon sources include glucose, sucrose, lactose, starch hydrolysate and molasses. Gaseous ammonia, aqueous ammonia, ammonia salts and other nitrogencontaining materials can be used as the nitrogen source.

- 55 Cultivation of the transformed organisms containing the vehicle carrying the ppc gene is conducted under aerobic conditions in which the pH and the temperature of the medium are adjusted to a suitable level and continued until the formation of L-amino acid ceases. In a preferred embodiment a transformed *Corynebacterium glutamicum* is used, selected from the group of those having the identifying characteristics of *Corynebacterium glutamicum* DSM 4697 deposited under the provisions of the Budapest Treaty on

July 8, 1988 at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM).

The amino acids, which accumulate in the culture medium, can be recovered by conventional procedures.

By the methods of the present invention, L-amino acids, especially L-lysine, can be produced in higher yields than has been achieved in previously known methods using artificial mutants of *Brevibacterium* and *Corynebacterium*.

Having generally described this invention, a further understanding can be obtained by reference to certain specific examples, which are provided herein for purposes of illustration only, and are not intended to be limiting, unless otherwise specified.

1. Isolation of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 *ppc* gene.

1.1 Construction of genomic bank of *C. glutamicum* ATCC13032

Total DNA from *C. glutamicum* ATCC13032 was isolated as described by Chater et al. (Curr. Topics Microb. Immunol. 96, 69 pp (1982)) and partially digested with *Sau*3AI. Fragments ranging in size from 4-20 kb were purified from low melting temperature agarose. The DNA solution, was dialyzed against 2 L of TE buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). 2 µg of size fractionated chromosomal DNA was ligated using T4 DNA Ligase with 1 µg of plasmid pUC18 (Yanish-Perron, C. et al. (1985) Gene 33, 103 pp) which had been digested with *Bam*HI and treated with alkaline phosphatase.

E. coli NM522 (Gough, J.A. and Murray, N.E. (1983) J. Mol. Biol. 166, 1 pp) was transformed according to Hanahan (J. Mol. Biol. 166, 557 pp (1983)) with the ligation mixture and transformants were selected at 37°C on LB agar plates (Davis, R.W. et al. (1980) Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) containing ampicillin (100 µg/ml) and 5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal, 50 µg/ml). 80 % of clones were colourless on X-gal plates, indicating the presence of inserted DNA. To estimate more precisely the efficiency of cloning, plasmid DNA from 46 colourless clones was examined by restriction enzyme digestion : 7 % of clones contained no inserts; 41 % of clones contained small inserts with an average size of 0.5 kb; 52 % of clones contained inserts ranging in size from 1.35 kb to 8.5 kb with an average size of 5 kb.

In total 10⁴ clones were obtained upon transformation of strain NM522. These clones were pooled in 4 families (CgSA, CgSB, CgSC and CgSD) and plasmid DNA was prepared by CsCl-EtBr density gradient centrifugation.

1.2 Cloning of the *ppc* gene

Competent cells of *E. coli* XH11 (Mountain, A. et al. (1984) Mol. Gen. Genet 197, 82 pp) were transformed with 5 x 200 ng of each of the families of the *C. glutamicum* gene bank. Transformation mixes were spread on M9 agar (Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) plus arginine (50 µg/ml) and ampicillin (100 µg/ml) and on LB plus ampicillin (100 µg/ml). A transformation frequency of 10⁴/µg was obtained on LB plus ampicillin. 108 clones were isolated on M9 agar containing arginine and ampicillin from the transformation with family CgSD. Restriction enzyme digestion of isolated DNA indicated that all clones contained the same plasmid. The plasmid (pTG1200) consisted of pUC18 plus an insert of approximately 5 kb. A restriction map of the insert of pTG1200 is shown in Figure 1. Retransformation of XH11 by pTG1200 led to complementation of the *ppc* mutation. Southern hybridisation (Maniatis, T. et al. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory) confirmed that chromosomal DNA of *C. glutamicum* ATCC13032 had been cloned in pTG1200.

1.3 Localization of the *ppc* gene on the cloned DNA fragment.

To better localize the *ppc* gene, subcloning experiments were undertaken. Digestion of pTG1200 with *Sall* generates an internal fragment of 3.5 kb (Figure 1). pTG1200 digested with *Sall* was ligated with *Sall* cut pBR322 (Bolivar, F. et al. (1974) Gene 2, 95 pp). To eliminate religated pTG1200 molecules the ligation mixture was digested with *Xba*I. *E. coli* XH11 was transformed with the ligation mixture and plated on M9 agar containing arginine and ampicillin. Plasmid DNA of complemented clones was examined and found to

consist of pBR322 plus the 3.5 kb Sall fragment of pTG1200,

The constructed plasmid was designated pTG1201 (Figure 2) and the corresponding strain XH11 pTG1201.

5

1.4 Measurement of enzyme activity in C. glutamicum ATCC13032 and in E. coli clones carrying a recombinant plasmid containing the DNA fragment with the C. glutamicum ppc gene.

Phosphoenolpyruvate carboxylase activity was assayed in C. glutamicum ATCC13032 and in E. coli strain XH11 pTG1201. E. coli strain MM294 (Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557 pp) was used as a positive control and strain XH11 as negative control. C. glutamicum ATCC13032 was cultivated in MMYE medium (Katsumata, R. et al. (1984) J. Bact. 159, 306 pp) and E. coli strains in M9 medium supplemented with arginine (50 µg/ml) and ampicillin (100 µg/ml) in the case of XH11/pTG1201, with thiamine (200 µg/l) in the case of MM294 and with sodium succinate (5 g/l) and arginine (50 µg/ml) in the case of XH11. The growth conditions were 37°C and 150 rpm for E. coli strains and 30°C and 150 rpm for C. glutamicum.

The cultures were harvested by centrifugation at the beginning of the stationary phase of growth and washed three times with a buffer composed of 100 mM Tris/HCl pH 7.5 and 1 mM DTT. Disruption of the cells was performed in a glass bead mill (MSK-Homogenisator; B. Braun Melsungen, FRG). PEP carboxylase activity in the clear supernatants was determined after extensive dialysis against 100 mM Tris/HCl pH 7.5; 0.8 M (NH₄)₂SO₄; 1 mM DTT. The modified malate dehydrogenase coupled assay (Ozaki, H. and Shilo, J. (1969) J. Biochemistry 66, 297 pp) was used and NADH disappearance was followed photometrically at 340 nm. The assay mixture included the following components: 6 mM PEP; 10 mM NaHCO₃; 100 mM Tris/HCl pH 7.5; 0.15 mM NADH; 2 U/ml malate dehydrogenase (pig heart); 3.3 mM MnSO₄ and PEP carboxylase preparation in a final volume of 1 ml. Unspecific NADH decomposition was measured before starting the reaction by addition of Mn⁺⁺. Protein concentration was determined by the methods of Lowry et al. (Lowry, O.H. et al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265 pp) or Bradford et al. (Bradford, M.M. (1976) Analyt. Biochem. 72, 248 pp).

The data shown in Table 1 confirm that the 3.5 kb Sall DNA fragment cloned from C. glutamicum ATCC13032, contained in plasmid pTG1201, encodes the phosphoenolpyruvate carboxylase gene.

In particular, the effect of acetyl-CoA known to stimulate phosphoenolpyruvate carboxylase from E. coli (Izui, K. et al. (1981) J. Biochem. 90, 1321 pp) and Brevibacterium flavum (Ozaki, H. et al. (1969) J. Biochem. 66, 297 pp) was investigated. From the results shown in Table 1 it is evident that phosphoenolpyruvate carboxylase from C. glutamicum ATCC13022, either produced in its original host or as a result of cloning into E. coli to form strain XH11/pTG1201, is not stimulated by acetyl-CoA under the assay conditions described above.

Table 1

Strains	Phosphoenolpyruvate carboxylase activity (U/mg protein)	
	without acetyl-CoA	in the presence 0.2 mM acetyl-CoA
<u>C. glutamicum</u> ATCC13032	0.226	0.225
<u>E. coli</u> MM294	0.035	0.158
<u>E. coli</u> XH11/pTG1201	1.010	1.090
<u>E. coli</u> XH11	0.0	0.0
Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in dialyzed homogenates obtained from <u>C. glutamicum</u> and from different <u>E. coli</u> strains.		

55

2. Determination of the nucleotide sequence of the ppc gene of C. glutamicum ATCC13032.

The nucleotide sequence of the entire 5 kb insert of pTG1200 was sequenced using a shot gun

approach (Messing, J. et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 309 pp). The SmaI site of pTG1200 was replaced by an XbaI site by cloning of a blunt ended oligomer (GTGTCTACAGTG) to generate a new plasmid called pTG1202. 10 µg of the 5.0 kb XbaI insert of pTG1202 was purified from low-melting-temperature agarose. The fragment was re-circularised using T4 DNA ligase, randomly fragmented by sonication and finally blunt ended using Klenow polymerase in the presence of 2 mM of each dATP, dGTP, dCTP and dTTP. Fragments ranging from 300-800 bp in size were isolated from low melting point agarose and ligated with SmaI digested M13mp8 phage (Messing, J. and Vieira, J. (1982), Gene 19, 269-276). 160 clones were sequenced by the chain termination method (Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 pp) and over-lapping clones indentified by computer-aided analysis (DNASTAR, Inc., 1801 University Ave, Madison, WI53705, USA). The entire sequence of the inserted DNA fragment contained in pTG1202 bearing the *ppc* gene of *C. glutamicum* ATCC13032 is shown in Figure 3.

The entire sequence which has been determined is 4885 bp in length. A search for possible protein encoding regions has revealed a long open reading frame (ORF) showing homology to *ppc* gene sequences from *E. coli* (Fujita, N. et al. (1984) J. Biochem. 95, 909 pp) and other organisms (katagiri, F. et al. (1985) Gene 38, 265 pp and Izul, K. et al. (1986) Nucleic Acids Res. 14, 1615 pp) indicating that this ORF encodes the PEP carboxylase gene. This ORF is contained within the 3.5 kb Sall DNA fragment extending between coordinates 652 and 4077, cloned in pTG1201. Sequence analysis identified two possible start sites of translation (coordinates 921 and 906) giving rise to a protein product of either 919 or 924 amino acids respectively.

2.1 Determination of the N-terminal sequence of the PEP carboxylase protein.

In order to precisely identify the initiation codon of the *ppc* gene product, the N-terminal amino acid sequence of the PEP carboxylase protein was determined.

Purification of PEP carboxylase from *C. glutamicum* ATCC13032 was performed after disruption of the cells using a glass bead MSK-Homogenisator. After precipitation of nucleic acids by 0-3% Streptomycin sulphate, a fractionated (NH₄)₂ SO₄ (0-50% and 50-70%) precipitation was performed. The redissolved pellet from the 50-70% (NH₄)₂ SO₄ precipitation was dialyzed against starting buffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5; 100 mM (NH₄)₂ SO₄; 1 mM DTT) and further purified by ion exchange chromatography on Q Sepharose fast flow. Gel-filtration on Sephacryl S300 superfine was then performed with the concentrated PEP carboxylase fractions: elution was with stabilizing buffer (100 mM Tris/HCl pH 7.5; 800 mM (NH₄)₂ SO₄; 1 mM DTT). Finally, samples were processed through an affinity chromatography step on Blue Sepharose, eluted using L-aspartate (70 mM) and dialyzed against stabilizing buffer to remove aspartate. The homogenous PEP carboxylase fractions - as proved by SDS-PAGE - were then concentrated by a factor of about four using a speed-vac concentrator at 5°C.

Desalting of enzyme fractions (1 ml containing about 25 µg of protein) was performed by dilution with 5 ml TRIS/HCl 100 mM pH 7.5. Samples were then concentrated to a final volume of 1.5 with a 8400 Amicon concentrator using a YM30 membrane (2.5 cm diameter). This procedure was repeated twice. The concentrated solution was divided into three (2 ml) Eppendorf tubes. Protein precipitation was then performed at -80°C 48 h after addition of ethanol (2 ml) in each Eppendorf tube. Pellets were pooled, washed twice with -80°C cooled ethanol/water (80/20 V/V). Samples were loaded on a precycle filter for sequencing after solubilization in formic acid. Sequencing was performed on an Applied Biosystem 470A protein sequencer with an on-line 120A PTH-analyser.

The obtained sequence is the following:

Thr¹-Asp-Phe-Leu-Arg⁵-Asp-Asp-Ile-Arg-Phe¹⁰-Leu-Gly-Gln-Ile -Leu¹⁵

This result shows that PEP carboxylase is encoded by the ORF of 919 amino acids stretching between the ATG codon at position 921 and the TAG codon at position 3878. The initiation codon lies about 14 base pairs downstream from a putative Shine-Dalgarno sequence (coordinates 900-908, Figure 3).

3. Cloning and expression of the *ppc* gene from *C. glutamicum* ATCC13032 in *C. glutamicum* ATCC13032.

3.1 Construction of the *C. glutamicum*/*E. coli* shuttle vector pZ1.

The structure of the plasmid shuttle vector pZ1 is shown in figure 4. It was constructed from *E. coli*

vector pACYC177 (Chang, A.C.Y. and Cohen, S.N. (1978) J. Bact. 134, 1141 pp) and from *C. glutamicum* plasmid pHM1519 (Miwa, K. et al. (1984) Agric. Biol. Chem. 48, 2901 pp) as disclosed in Deutsche Patentanmeldung 3737729.9 *E. coli* strain DM272-3 containing plasmid vector pZ1 was deposited at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen under DSM4242.

3.2 Cloning of the *ppc* gene onto the *C. glutamicum*/*E. coli* shuttle vector pZ1.

Plasmid pTG1200 was isolated from *E. coli* XH11/pTG1200 and partially digested with *Sau*3A and plasmid pZ1 isolated from DM272-3 (= DSM4242) was linearized with *Bq*III. Both DNAs were mixed, ligated with T4 DNA Ligase and the ligation mixture used to transform *E. coli* XH11. Transformants were selected on M9 agar containing arginine (50 µg/ml) and Kanamycin (10 µg/ml). Plasmid-DNA from one of the transformants called XH11/pDM2 was isolated and characterized by restriction mapping. The structure of pDM2 is shown in Figure 5. Enzyme measurements revealed that strain XH11/pDM2 had a phosphoenolpyruvate carboxylase activity which was not stimulated by acetyl-CoA (Table 2) as was shown in Table 1 for strain XH11/pTG1201.

Table 2

Strains	Phosphoenolpyruvate carboxylase activity (U/mg protein)	
	without acetyl-CoA	in the presence of 0.2 mM acetyl-CoA
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	0.226	0.225
<i>E. coli</i> XH11	0.0	0.0
<i>E. coli</i> XH11/pDM2	0.261	0.272
Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in dialyzed homogenates obtained from <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 and from <i>E. coli</i> strains XH11 and XH11/pDM2.		

3.3 Construction of the *C. glutamicum* vector PCV22.

Plasmid pHM1519 (Miwa, K. et al. (1984) Agric. Biol. Chem. 48, 2901 pp) isolated from *C. glutamicum* ATCC13058 was cut with *Bgl*II and ligated to the pUCB (Vieira, J. and Messing, J. (1982) Gene 19, 259 pp) derivative pSVB21 (Arnold, W. et al. Gene (1988) 70, 171 pp) cut with *Bam*HI. The ligation mixture was used to transform *E. coli* strain JMB3 (Vieira, J. and Messing, J. (1982) Gene 19, 259 pp) and transformants were selected on LB agar containing ampicillin. Plasmid DNA was isolated from one of the transformants and called pECS100.

The Kanamycin resistance gene of Tn5 (Jorgensen, R.A. et al. (1979) Mol. Gen. Gen. 177, 65 pp) was isolated as an *Xho*I-*Sal*I DNA fragment from a pACYC184 (Chang, A.C.Y. and Cohen, S.N. (1978) J. Bact. 134, 1141 pp) derivative carrying Tn5 and inserted into the *Sal*I site of pECS 100 to form pECS300 which was transferred to *C. glutamicum* ATCC13032 by transformation (Yoshihama, M. et al. (1985) J. Bact. 162, 591 pp).

Plasmid pECS300 was isolated from strain ATCC13032/pECS300 digested with *Sma*I, religated and used to transform *C. glutamicum* ATCC13032. Plasmid was isolated from one of the transformants, characterized by restriction mapping and called pECS330.

The *E. coli* replicon including the β -lactamase resistance gene was deleted from pECS330 by digestion with *Hind*III, religation and transformation to form the *C. glutamicum* vector pCV20.

Plasmid pCV20 was digested with *Sma*I and ligated with the 0.322 Kb *Pvu*II fragment of pUC19 carrying the *E. coli lacZ* promoter and the multiple cloning site (Yanisch-Perron, C. et al. (1985) Gene 33, 103 pp). *C. glutamicum* ATCC13032 was transformed with the ligation mixture. Plasmid DNA was isolated from one of the transformants, named pCV22 and its structure confirmed by restriction mapping. The structure of pCV22 including its construction as described above is shown in figure 6.

3.4 Cloning of the ppc gene onto the C. glutamicum vector pCV22.

Plasmid pDM2 was isolated from *E. coli* strain XH11/pDM2 by ethidium bromide CsCl density gradient centrifugation and used to transform C. glutamicum ATCC13032 as described by Yoshihama et al. (J. Bact. 162, 591 pp (1985)). Plasmid DNA was isolated from one of the transformants and shown to have the structure of pDM2.

Plasmid pCV22 was isolated from ATCC13032/pCV22 cut with Sall and treated with calf intestine alkaline phosphatase. Plasmid pDM2 was cut with Sall and SmaI. Both DNA's were mixed, ligated with T4 DNA Ligase and the ligation mixture used to transform C. glutamicum ATCC13032 (Yoshihama, M. et al. (1985) J. Bact. 162, 591 pp). Plasmid DNA designated pDM6 was isolated from one of the transformants and characterized by restriction mapping. The structure of pDM6 is shown in Figure 7.

3.5 Measurement of enzyme activity in C. glutamicum clones carrying a recombinant plasmid containing the DNA fragment with the ppc gene.

Phosphoenolpyruvate carboxylase was measured in C. glutamicum strains ATCC13032/pCV22, ATCC13032/pDM2 and ATCC13032/pDM6. The result is shown in Table 3.

Table 3

<u>C. glutamicum</u> strains	Phosphoenolpyruvate carboxylase activity (U/mg protein) in the absence of acetyl-CoA
ATCC13032/pCV22	0.250
ATCC13032/pDM2	0.240
ATCC13032/pDM6	0.996
Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in dialyzed homogenates obtained from different <u>C. glutamicum</u> strains.	

4. Effect of plasmid pDM6 on PEP carboxylase activity and on the lysine excretion of the lysine excreting strain C. glutamicum DM58-1.

C. glutamicum strain DM58-1 is a derivative of strain ATCC13032, resistant to 50 mM of the L-lysine analogue S-2-aminoethyl-DL-cysteine, obtained after conventional N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine mutagenesis.

Plasmid pDM6 and as a control plasmid pCV22 were introduced into C. glutamicum DM58-1 to give strains DM58-1/pDM6 and DM58-1/pCV22. Strain DM58-1/pDM6 was deposited at the Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen under DSM4697. The results obtained by measuring the specific PEP carboxylase activity and the concentration of excreted lysine as well as sucrose consumption are shown in Table 4.

The stimulating effect of the elevated level of PEP carboxylase exerted by the cloned ppc gene of plasmid pDM6 on the concentration of lysine excreted and in particular on the yield which is the amount of lysine formed per amount of sucrose consumed is evident.

5	Strains	PEP carboxylase activity (U/mg protein)	Concentration of L-lysine excreted (g/l)	Yield <u>g L-lysine</u> g sucrose
10	<u>C. glutamicum</u> DM58-1	0.275	16.1	0.170
15	<u>C. glutamicum</u> DM58-1/pCV22	0.240	15.9	0.173
20	<u>C. glutamicum</u> DM58-1/pDM6	0.955	17.9	0.198

25 **Table 4:** Effect of increased level of PEP carboxylase on lysine excretion by C. glutamicum.

30 The cultivation was carried out in 100 ml-flasks with indentations containing 10 ml of a medium composed of 12 g/l ammoniumsulfate, 240 g/l molasses, 60 ml/l soy bean protein hydrolysate and 10 g/l CaCO₃. In the case of strains DM58-1/pCV22 and DM58-1/pDM6 the medium contained 20 µg/ml kanamycin. Incubation was carried out for 48h at 30°C and at 300 rpm. After completion of the cultivation lysine in the culture supernatant was quantitatively determined by amino acid analyzers using ion exchange chromatography and ninhydrin detection. Sucrose was quantitatively determined by an enzymatic assay using invertase coupled to hexokinase and glucose-6-phosphat dehydrogenase (Technicon Application Note 35 AAll: Saccharose and Glucose).

5. Effect of plasmid pDM6 on the threonine and isoleucine excretion of strain B. flavum DM368-2

40 B. flavum strain DM368-2 is a derivative of strain ATCC14067, resistant to 4 mg/ml of the threonine analogue α -amino- β -hydroxy-valeric acid, obtained after conventional N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine mutagenesis.

45 Plasmid pDM6 was isolated from C. glutamicum DM58-1/pDM6 (= DSM4697) and introduced into B. flavum DM368-2 to give strain DM368-2/pDM6. Strain DM368-2 was deposited at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen under DSM 5399. The effect of plasmid pDM6 on the concentration of excreted L-threonine and L-isoleucine as well as sucrose consumption are shown in Table 5.

50 The stimulating effect of the cloned ppc gene contained in plasmid pDM6 on the concentration of threonine and isoleucine excreted and in particular on the yield which is the amount of amino acid formed per amount of sucrose consumed is evident.

5	Strains	Amino acid excreted	Concentration of amino acid excreted g/l	Yield g amino acid g sucrose
10	<i>B. flavum</i> DM368-2	L-threonine L-isoleucine	3.32 0.92	0.0324 0.0090
15	<i>B. flavum</i> DM368-2/pDM6	L-threonine L-isoleucine	3.77 1.08	0.0370 0.0106

Table 5: Effect of pDM6 on threonine and isoleucine excretion by *B. flavum*.

The cultivation was carried out as described under 4.

Figure 1: Restriction map of the insert of pTG1200.

Figure 2: Restriction map of pTG1201.

Figure 3: Nucleotide sequence of the DNA fragment inserted into pTG1200 containing the ppc gene.

Figure 4: Restriction map of pZ1.

Figure 5: Restriction map of pDM2.

Figure 6: Construction and restriction map of pCV22.

Figure 7: Restriction map of pDM6.

Claims

1. A DNA fragment isolated from a *C. glutamicum* strain containing a genetic sequence comprising information coding for the production of a protein having the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC).
2. The DNA fragment of Claim 1, which consists essentially of a fragment of 3422 base pairs flanked at its termini by Sal I restriction sites.
3. The DNA fragment of Claim 1 or 2, which consists of 2757 base pairs coding for the structural gene of PEPC.
4. The DNA fragment of any of the Claims 1, 2 or 3 coding for the production of PEPC, which shows the N-terminal amino acid sequence Thr¹ - Asp - Phe - Leu - Arg⁵ - Asp - Asp - Ile - Arg - Phe¹⁰ - Leu - Gly - Gln - Ile - Leu¹⁵.
5. The DNA fragment of any of the Claims 1, 2, 3 or 4 isolated from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.
6. A vehicle capable of replication in *Corynebacterium* or *Brevibacterium* containing the DNA fragment of any of the Claims 1, 2, 3, 4 or 5.
7. The expression vehicles of Claim 6, which are the plasmids pDM2 or pDM6.
8. A host bacterium belonging to the genus *Corynebacterium* or *Brevibacterium* containing the vehicle of the Claims 6 or 7, optionally producing the amino acid of interest.
9. A *Corynebacterium* which is selected from the group of those having the identifying characteristics of DSM 4697.
10. A *Brevibacterium* which is selected from the group of those having the identifying characteristics of DSM 5399.
11. A method of producing L-amino acid selected from L-lysine, L-methionine, L-threonine, L-isoleucine, L-glutamate, L-glutamine, L-proline, L-arginine, L-citrulline and L-ornithine by fermentation which comprises culturing in an appropriate medium a bacterium of Claims 8, 9 or 10 and recovering the L-amino acid from said medium.
12. A method of producing L-lysine by fermentation according to Claim 11, which comprises culturing

the bacterium of the Claims 8 or 9 and recovering L-lysine.

13. A method of producing L-isoleucine and L-threonine by fermentation according to claim 11, which comprises culturing the bacterium of the Claims 8 or 10 and recovering L-isoleucine and L-threonine.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

1 Kb

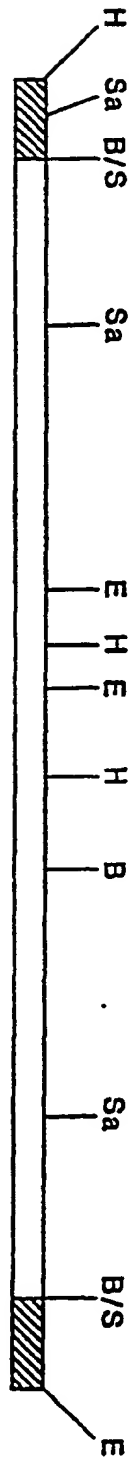


FIGURE 1 : RESTRICTION MAP OF THE INSERT OF PLASMID pTG1200

Legends to symbols: Open bar: 5 kb insert; dashed bars: polylinker of pUC18 vector. H, HindIII; Sa, SalI; B, BamHI; E, EcoRI; B/S, BamHI/Sau3A hybrid.

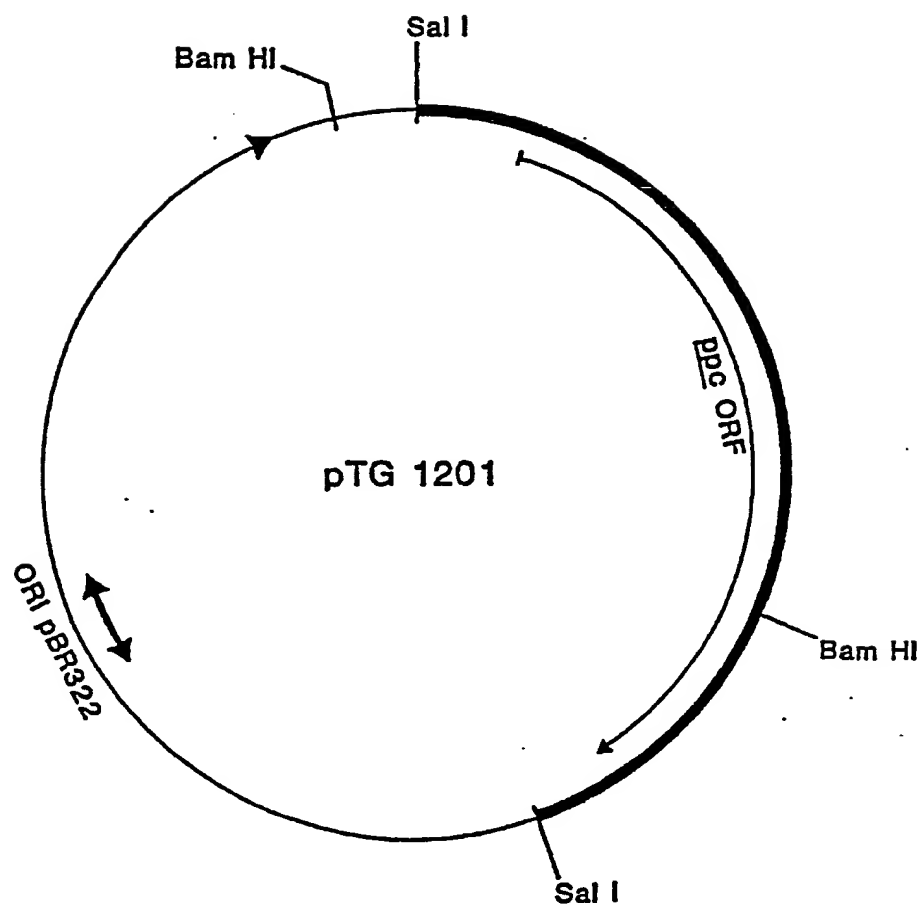


FIGURE 2 : RESTRICTION MAP OF PLASMID pTG1201

Thick line: 3.5 kb SalI fragment bearing the ppc ORF.
Thin line : pBR322 vector. ► indicates position and orientation of the promoter of the tetracycline resistance determinant.

The predicted amino acid sequence corresponding to phosphoenolpyruvate carboxylase is indicated underneath the corresponding DNA sequence.

GATCACGACAGGCAATCGGCACCTGTTCAAGAGCTTGCAATCGGCCCTTCCAAAGGAATACCTTCGAGAGAGGTTGACGTTGCAGTGCACCGTTCCTTTCACTG
 100
 ACAATCCGCTCCGTCACAGACTCTCGTTGAGGGCGACAAGCTTGAGGTCACCTTCAGGTCACTTTCGGTGCTCAGGACGTCCTCCAGCAGCAGATCCGGTGCGTACACCGGTGA
 200
 AGTTTCTGCAAGCATGCTGGCAAAGTTGAACCTGCTCTTGGGTTGTCTTGGACACTCCGAGGCGCCGAGTACCACCAACGAGTCTGATGAGTTGGTTGCT
 300
 GCGAAGGCAAGGGCAGCTCTGTCCAAGGGCATCAGCCCGATCGTCTGGGTTGGTGAGCCACTGGAAATCCGTTGAAGCTGGCACCACCCACGTTGAGTACGTGG
 400
 TCGAGCAGACCCGTAAGTCCCTTGCTGGCCCTGGATGCTGAGCTGGCAACACCGTTATCGGGTATGAGCCAGTGTGGGCTATCGGSCACCGGTAAAGGT
 500
 TGCTTCCGCAGCTGACCGCTCAGGAAGTGTGCAAGGCTATCCGGGTTCTGATCGTGGAGCTTGCAGGCGCAGGAGTGGCTGAGGGCCCTGCGTATCTTTAC
 600
 GGGTGGTCTGTTAAGGCAGAAACCGTCGCTGAGATCGTGGTCAGCCTGACGTCGACGGCGGACTTGTGGTGGGCTTCCCTCGACGGGTGAAGCATTCG
 700

CCAAGCTGGCTGCCAACGCTGGAGCGTTGCTTAAAGTACAGAGCTTTAAAGCACAGCCTTAAAGCACAAAGCACTGTAGAAGTGGGG
 800
 TTTTGATGAGCCCAATGAAAGCCATCGAAATCAATGCCCCAGCTAAACACCTGTTTGGCTGGGTGATTTTATCTCATGCACGCGCAACACCCCTCAATGTG
 900
 AAAGAGTGTTAAAGTAGTTATGACTGATTTTTTACGGGATGACATCAGGTTCTCTGGTCAAAATCCTCGGTGAGGTAATTGCGGAAACAAGAGCGCAGGA
 1000
 m t d f l r d d i r f l g q i l g e v i a e q e g q e
 GGTATTATGAAGTGGTTCGAACGAGCGGCTGACTTCTTTTGATATCGCCAAAGGCAACGCCGAATGGATAGCCTGGTTCAGGTTTTTCGACGGGCATTACT
 1100
 v y e l v e q a r l t s f d i a k g n a e m d s l v q v f d g i t
 CCAGCCAAAGGCAACACCGATTGCTCGCGCAATTTTCCCACTTCGCTCTGCTGCTTAACCTGCGCGCAAGACCTCTACGATGAAGAGCTTCGTGAACAGGCTC
 1200
 p a k a t p i a r a f s h f a l l a n l a e d l y d e e l r e q a l
 TCGATGCAAGGCGACACCCCTCCGGACAGCAGCTCTTGATGCCACCTGGCTGAAGAACTCAATGAGGGCAATGTTGGCGCAGAAGCTGTGGCCGATGTGCTGCG
 1300
 d a g d t p p d s t l d a t w l k l n e g n v g a e a v a d v l r
 CAATGCTGAGGTGGCGCGGTTCTGACTGGCACCACCACTGAGACTCGCGCGCGCAGCTGTTTGTATGCGCAAAAGTGGATCACCACCCACATGCGTGAA
 1400
 n a e v a p v l t a h p t e t r r r t v f d a q k w i t t h m r e

CGCCACGGCTTTCAGTCTGCGGAGCCTACCGCAAGCAAGTTGGATGAGATCGAGAACAACATCCGCCGTGGCATCACCATTTTTGTGGCAGA
r h a l q s a e p t a r t q s k l d e i e k n i r r i t i l w q t
-----+-----
1500

.CGCGGTGATTGCTGCGGCCCGCCACGTATCGAGGACGAGATCGAAGTAGGGCTCGGTACTACAAGCTGAGCCTTTTGGAAGAGATTCACCGTATCAA
a l i r v a r p f e d e i e v g l r y y k l s l e e i p r i n
-----+-----
1600

C CGTGATGTGGCTGTTGAGCTTCGTGAGCGGTTTCGGCGAGGGGTTCCTTTGAAGCCCGTGGTCAAGCCAGGTTTCCTGGATYTGSTGGAGACCACGACGGT
r d v a v e l r e r f g e g v p l k p v v k p g s w i g d h d g
-----+-----
1700

AACCCYYATGTACCGGGAAACAGTYGASTATTCACTCACCGCGCTCGGGAACCGTGTCMAAGTACTATGCACGCCAGCTGCAYTECBTCGAGCATG
n p y v t a e t v e y s t h r a a e t v l k y y a r q l h s l e h e
-----+-----
1800

AGCTCAGCCTGTGGACCGCATGAATAAGBGCACCCCGCAGCTGCTTGGCGTGGCAGATGCAGGGGCACAACGACGTGCCAAGCCGGTGGATGAGCCTTA
l s l s d r m n k v t p q l l a l a d a g h n d v p s r v d e p y
-----+-----
1900

TGGACCGCGCTCCATGGCGTTCGGGACGYATCCTCGGACGACGGCCGAGCTGATCGGCGAGGACGCCGTTGAGGGCGTGTGGTTCAAAGGTCCTTACT
r r a v h g v r g r i l a t t a e l i g e d a v e g v w f k v f t
-----+-----
2000

CCATACGCATCTCGGAAGAATCTTAAACGATGGTTCACCATTCATCTCTCGGTGAJTCCAAGGACGTTCTCATYTGCCGAIGATCGTTTGTCTG
p y a s p e e f l n d a l t i d h s l r e s k d v l i a d d r l s v
-----+-----
2100

l i s a i e s f g f n l y a l d l r q n s e s y e d v l t e l f e

ACGGGCECAAGTCACCGCAAACTACCGCGAGCTGTCTGAAGCAGAGAAGCTTCAGGTCTGCTGAAGGAACCTGGCAGGCCCTCGTCGCTGATCGCGCAG
r a q v t a n y r e l s e a e k l e v l l k e l r s p r p l i p h

GGGTTGAGATGAATACAGGAGGTACCGACCGGAGCTCGGCATCTTCCGACCGCGTCGGAGGCTTTAAGAAATTCGGGCCACGGATGGTGCCTCACT
g s d e y s e v t d r e l g f f r t a s e a v k k f g p r m v p h c

GCATCATCTCCATGGCATCGGTCACCGATGTGCTCGAGCCGATGGTGTGCTCAAGGAATTCGGACTCATCGCAGCCCAAGCGGCGACAACCCACGGGG
i f s m a s s v t d v l e p m v l l k e f g l i a a n g d n p r g

t v d v i p l' f e t i e d l q a g a g i l d e l w k i d l y r n y
CACC GTG CAT C C C C A C T G T T C G A A C C A T C G A A G A T C T C C A G G C C G C C C G G A A T C C T C G A C G A A T T G G A A A T T G A T C T C T A C C G C A A C T A C

TTTCTCTGCAGCGCGGACACGTCAGCGAAGTCATGCTCGGTTACTCCGATTCCAAACAGGATGCGGGATATTTCTCCGCAAACTGGGCGCCTTACGACGGGG
lllqqrrdnnvqqevmlgysdsdnkdgggyfsanwalysdae

Not dated - 2200
Not dated - 2300

EP 0 358 940 A1

2020

2300

0072

050

9603

007

Figure 3 continued (e)

AACTGCAGCTGGTCGAACATATGCCGATCAGCGGGGTC AAGCTTCGCTGTTCCACGGCCGTTGGTGGCACTGGTGGCGGACCTTCCTACGA

l q l v e l c r s a g v k l r l f h g r g g t v g r g g p s y d

2800

CGCGATTCTTGCCCAAGCGGGGCTGTCCAAGTTCCGTGGCATCACCGAGCAGGGGCGAGATCATCTCCGCTAAGTACGGCAACCCCGAAACCGCG

a f l a q p r g a v q g s v r i t e q g e i f s a k y g n p e t a

2900

CGCCGAAACCTCGAAGCCCTGGTCTCAGCCACGCTTGAGGCAATCGCTTCTCGACGGTCTCCGAACTCACCGATCACCAACGCGCGTACGACATCATGAGTG

r r n l e a l v s a t l e a s l l d v s e l t d h q r a y d i m s e

3000

AGATCTCTGAGCTCAGCTTGAAGAGTACGCCCTCCTTGGTGACGAGGATCAAGGCTTCATCGATTACTTACCAGTCACGCGCGCTGCAGGAGATTGG

i s e l s l k k y a s l v h e d q g f i d y f t q s t p l q e i g

3100

ATCCCTCAACATCGGATCCAGGCTTCCTCAGCGCAAGCAGACCTCCTGGTGGAAAGATTTCGAGGCCATCCCATYGGTGCTCAGCTGGTCAAGTCTCGT

s l n i g s r p s s r k q t s s v e d l r a i p w v l s w s q s r

3200

GTATGCTGCCAGGCTGGTTGGTGTCGGAAACCGCATTAGAGCAGTGCATTGGCGAAGGGGAGCAGGCCACCCAAACCATTTGCCGAGCTGCAAAACATCA

v m l p g w f g v g t a l e q w i g e g e q a t q r i a e l q t l n

3300

ATGAGTCTCTGGCCATTTTTCACCTCAGTGTGGATAACATGGCTCAGGTGATGTCCAAAGGCAGAGCTGCGTTTGGCAAAAGCTCTAGGCAGACCTGATCCC
e s w p f f t s v l d n m a q v m s k a e l r l a k l y a d l l p
3400

AGATACGGAAAGTAGCCGAGCGAGTCTATTCCGTCTATCCGGCAGGAGTACTTCCTGACCAAGAAAGATGTTCTGGTAATCACCAGGCTCTGATGATCTGCTT
d t e v a e r v y s v i r e e y f l t k k m f c v i t g s d d l l
3500

GATGACAAACCACCTTCTGGCAGCTCTGTCCAGGCGCGATACCCCTACCTGCTTCCACTCAACGCTGATCCAGGTAGAGATGATGCGAGGCTACCGAAAG
d d n p l l a r s v q r r y p y l l p l n v i q v e m m r r y r k g
3600

GGACCAAAGCGAGCAAGTGTCCCGCAACATTTCAGGTGACCATGAACGTTCTTTCCACTGGGCTGGCAACTCCGGCTAGTCCAGCGCGCTGGGTAGTAC
d q s e q v s r n i q l t m n g l s t a l r n s g .
3700

TCGTGTACTGCTAAAGTTATTCCGAATCAGGTGGGCATAAGGTTACCTGGGTCTCAAAAGGCAAGGAACATTTCCACATGGCATTGACGCTTC
3800

AAATCATCTCGTGGCCAGCGCTGCTCATGACGGTTTTCGTCTTGTCTGCACAAGGGCAAGGGCGGGACTCTCCAGCCCTCTTCGGTGGCGGTGTGCA
3900

GTCCAATCTTCCGGCTCCACTGTTGTTGAAAAGAACCTGGATCGCGTCAACCATTTTGGTGGCGTTATCTGGATTGCTGATGTCGCACCTCAACCTC
4000

Figure 3 continued (g)

ATCCAGACTTATTTCATAGACACGAGCTTAAAAAGAGCGGTCCCTTTTCATAGGGAGCGCGCTTTTTCGGGTTTGTCTCGACCTGTTGTCTCCCCACCTGT
 4100
 TCCTCGGTGTGCACCTTTCGACACCAAGATTTCGGCAAGTGGTGGTCAAAATCTTGGTGCCTAATTCACATACATTCCTAAATTTTCCCTAAGG
 4200
 ACATCTTTAAAGGGGAACCTGTTCCCGACGGGAACGTGGAGTCTATAAAACCGCAGGTTAAACCGCTGCCATAGGGGATTTTTCGGCTGGGGAGACGCTGGT
 4300
 GTAAGTGGGGTTAAAAACGTGACCTTCGTTATAAAACAGAAATCTATAGAACGATAGGTAAAACTGGACTAGGTTTATCTATAGCGGAATAGAAAAAT
 4400
 ACTCCGCTCGACAGCATCACTTAGCTGAAAGGCCTTAACATGGACCCCTCAGATCTAGCTGGATTTTCGCCAGCTTTTCGGTGGTAAGCCTGATGTTT
 4500
 CCGGGATTGTCCCTGCTACGGCGGCGATGCTGGGTGGGCAACACAGTTCTTAACACGTTCTATGATGGTTATGAGCTCACTTGAATCATCAGCCTTGTGT
 4600
 ACATCATTTATGGACACGGACTTGTCTTAGGAACTCCATCGGTGGTGGGGAATTATCGGAAATCCCTTGAATYACTTCGGCTTCGGCAACATTATGGA
 4700
 AGATCAGCGGCACCGGAGACCTCATGTGGGCGGCTTCTACATTCTGTTCGCTGCAATCTCAGCTGGCAGCTTGTTCATCTGTGTGCGAGCGGGGCGCATGCGC
 4800
 TTTGGAGCGTGGCTGGTCTTCGGTGTCTCTGTGGTTCACCTTTGTGTACCGGCCACTGGCACACTGGGTTTTCGCTATCGATGATC
 4885

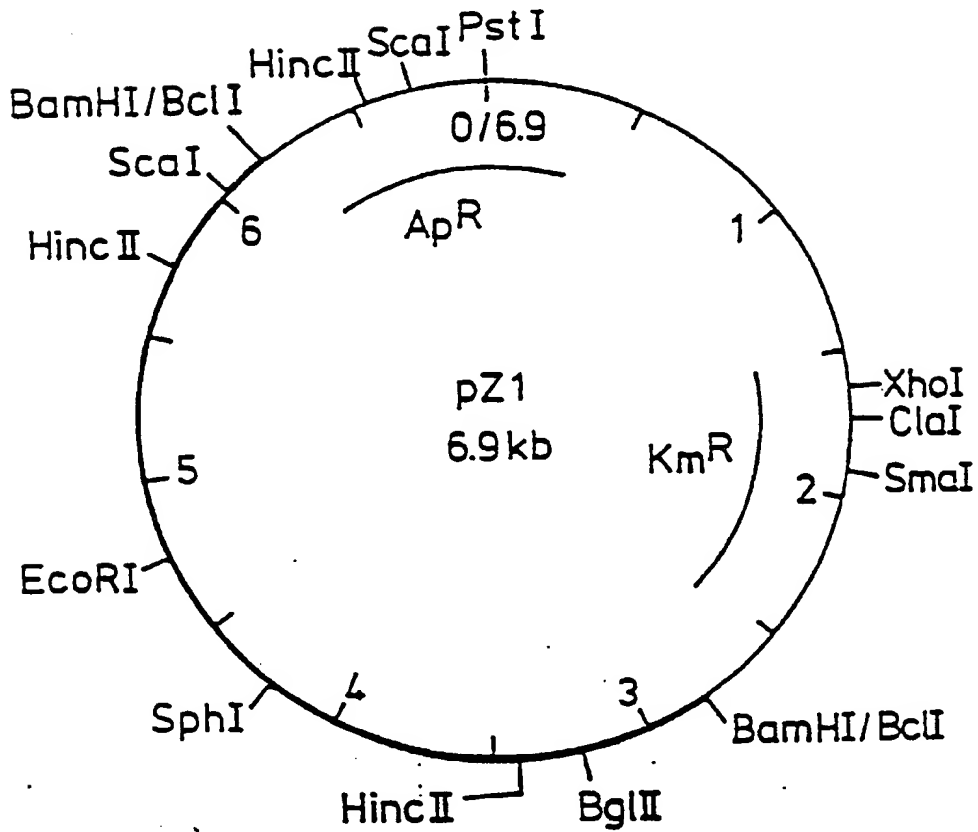


Figure 4: Restriction map of pZ1.

Neu eingereicht / Not
Neu eingereicht / Not

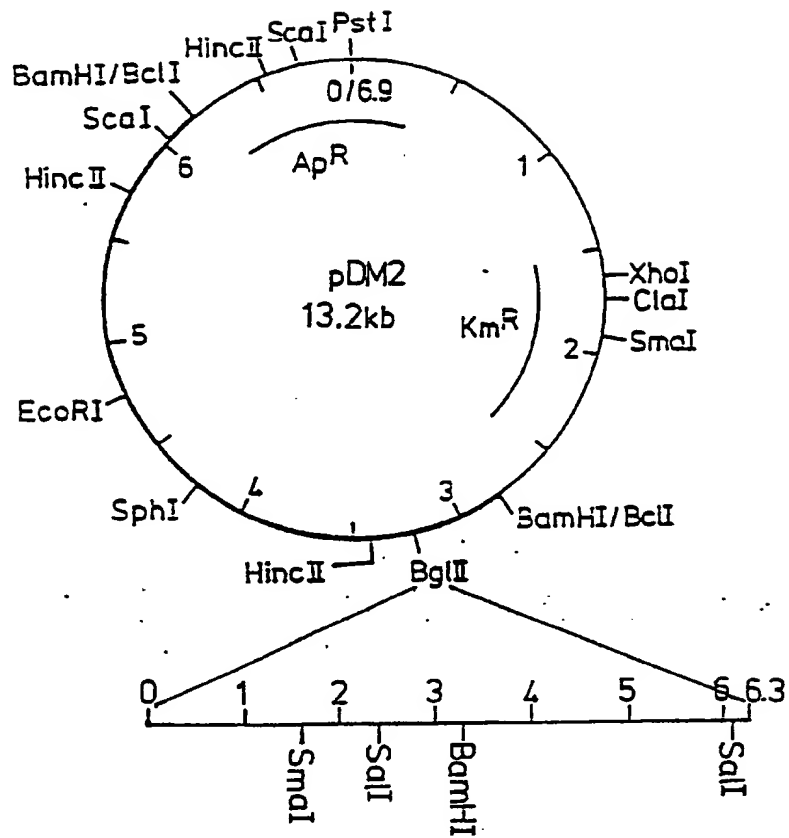


Figure 5: Restriction map of pDM2.

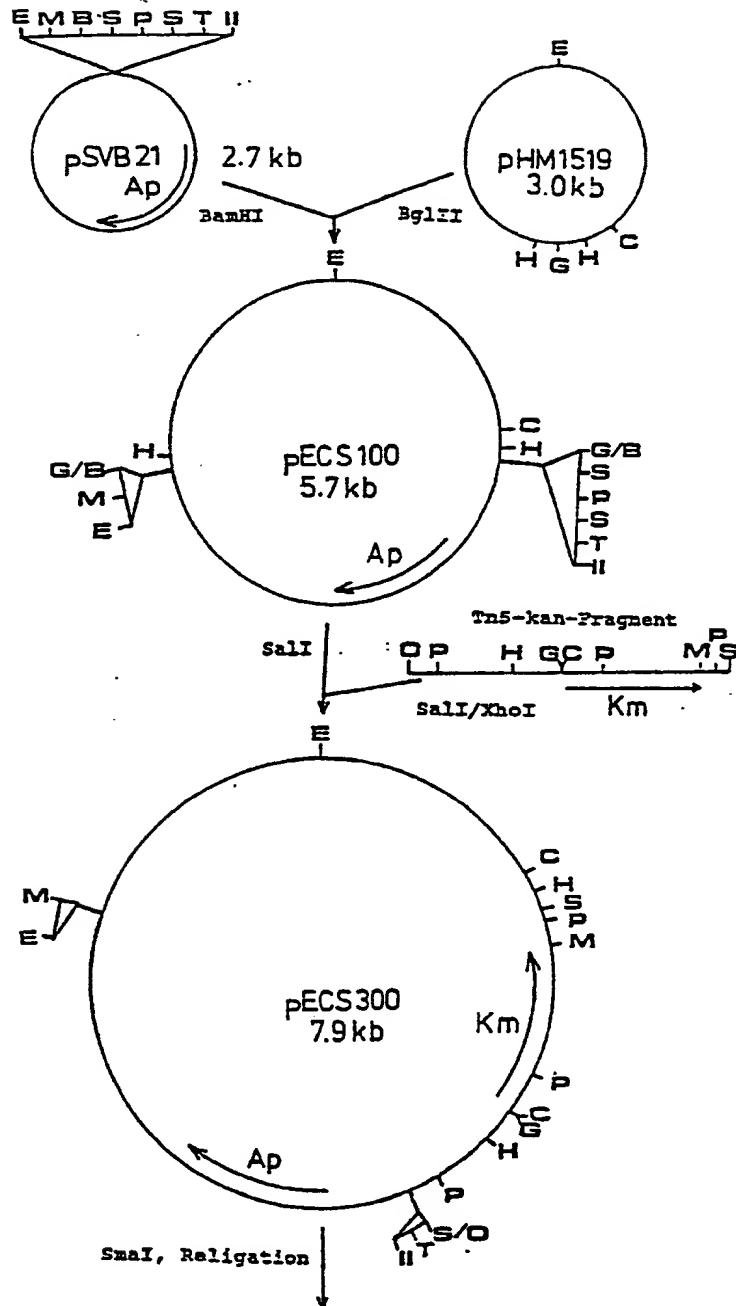


Figure 6:

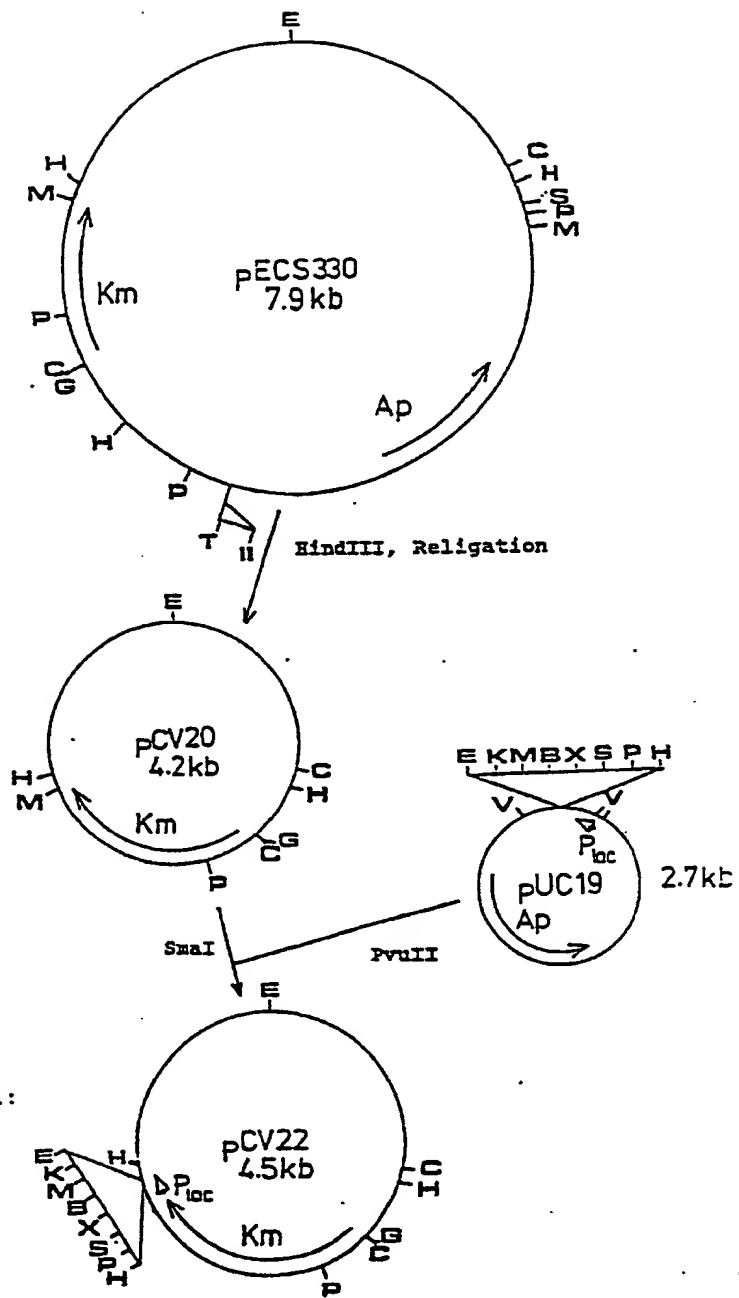


Figure 6 contd.:

Figure 6 contd.: Construction and restriction map
of pCV22. Legends to symbols:

B	: BamHI
C	: BclI
E	: EcoRI
G	: BglII
H	: HindIII
K	: KpnI
M	: SmaI
O	: XhoI
P	: PstI
S	: SalI
T	: Tth111I
V	: PvuII
X	: XbaI
II	: BstEII
Ap	: Ampicillin resistance gene
Km	: Kanamycin resistance gene
P _{lac}	: Promoter of <u>E.coli lac</u> operon
kb	: Kilo base pairs

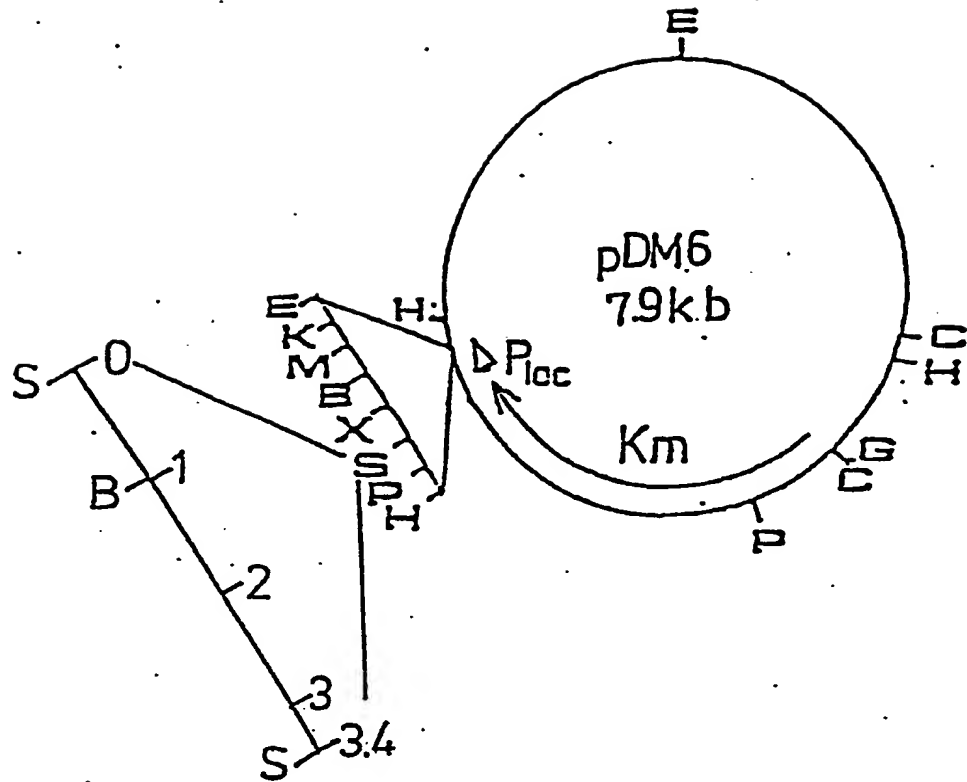


Figure 7: Restriction map of pDM6. See figure 6 for legends to symbols.



European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application number

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			EP 89114632.6
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.) ⁵
D,X	<u>FR - A1 - 2 581 653</u> (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA) * Abstract * ---	1,11- 13	C 12 N 15/60 C 07 H 21/04 C 12 N 1/20 C 12 N 9/88 C 12 P 13/04
D,X	<u>EP - A1 - 0 143 195</u> (AJINOMOTO CO., INC.) * Claims * ---	1,11- 13	C 12 P 13/08 C 12 P 13/12 C 12 P 13/06 C 12 P 13/14
A	<u>EP - A2 - 0 179 338</u> (AJINOMOTO CO., INC.) * Abstract; pages 18-20 * -----	1,11- 13	C 12 P 13/24 C 12 P 13/10 /(C 12 N 1/20 C 12 R 1:15) (C 12 N 1/20 C 12 R 1:13)
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.) ⁵
			C 12 N C 07 H C 12 P
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search VIENNA		Date of completion of the search 21-11-1989	Examiner WOLF
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-184366

(43)公開日 平成5年(1993)7月27日

(51)Int.Cl.⁵

C12N 15/00

識別記号

庁内整理番号

A 8931-4B

FI

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数8(全27頁)

(21)出願番号 特願平4-24658

(22)出願日 平成4年(1992)1月14日

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 谷野 信剛

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 久留主 泰朗

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA及びその利用

(57)【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233

からアスパルトキナーゼをコードするDNAを単離し、
この遺伝子の塩基配列を決定した。

【効果】 このアスパルトキナーゼをコードする遺伝子
DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラ
ズミドで形質転換されたプレバクテリウム・フラバム
MJ-233株は、L-リジンの生成量が増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 コリネ型細菌がブレヴィバクテリウム・フ

ラバム (Brevibacterium flavum) MJ 233である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

【化1】

```
GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCTCGCTTG AGAGTCCGGA ACCATTAGA 60
AACGTGCTG AACGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGGAA ATAATGTCGT GGTGTCTGC 120
TCCGAATGG GAGACACCAC GGATGAGCTT CTAGAACTTG CTGCGGCAGT GAATCCCCTT 180
CCGCCAGCTC GTGAAATGGA TATGCTCTG ACTGCTGGTG AGCGTATTTC TAACGCTCTC 240
GTGCCCATGG CTATTGAGTC CCTGGGTGCA GAGGCTCAAT CTTTCACGGG TTCTCAGGCT 300
GGTGTGCTCA CCACCGAGCG TCACGGAAAC GCAOCCATTG TTGATGTCAC TCCAGGTGCT 360
GTGCGTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCATTGTTG CTGGTTTCCA GGGTGTCAT 420
AAGGAAACCC GCGATGTCAC CACGTTGGGT CGCGGTGGTT CTGATACCAC TGCAGTTGCA 480
TTGGCAGCTG CTCTGAACCG TGATGTGTGT GAGATTTACT CAGATGTTGA CGGCGTGAC 540
ACCGCTGACC CGCGCATCGT TCCTAATGCT CAGAAGCTGG AAAAGCTCAG CTTCGAAGAA 600
ATGCTGGAAC TTGCTGCTGT TGCTCCAAG ATTTTGGTGC TACGCAGTGT TGAATACGCT 660
CGTGCAATCA ATGTGCCACT TCGCGTACCG TCGTCTTATA GCAATGATCC CGGCACTTTG 720
ATTGCCGGCT CTATGCAGGA TATCTCTGTG GAAGAAGCAG TCCTTACCGG TGTGCAACC 780
GACAAGTCCG AAGCCAAAGT AACCGTTCTG GGTATTTCCG ATAAGCCAGG CGAGGCTGCG 840
AAGGTTTTCC GTGCGTTGGC TGATGCAGAA ATCAACATTG ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900
TCCTCTGTGG AAGACGGCAC CACCGACATC ACGTTCACCT GCCCTCGCTC TGACGGACGC 960
CGTGCGATGG AGATCTTGAA GAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGCTTTAC 1020
GACGACCAGG TCGGCAAAGT CTCCCTCGTG GGTGCGGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080
ACCGCAGAGT TCATGGAAGC TCTGCGCGAT GTCAACGTGA ACATCGAATT GATTTCCACC 1140
TCTGAGATCC GCATTTCCTG GCTGATCCGT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGACGTCGCA 1200
CTGCATGAGC AGTTCCAGCT GGGCGGGCAA GACGAAGCCG TCGTTTATGC AGGCACCGGA 1260
CGC
```

で示されるアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

【化2】で示されるアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子

を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【請求項8】 グルコースを、請求項7記載のコリネ型細菌の培養菌体又は菌体処理物と接触させてL-リジンを生成せしめることを特徴とするL-リジンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、アスパルトキナーゼ

(E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子を含むコリネ型細菌由来の遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、及び該コリネ型細菌を用いるL-リジンの製造法に関する。

【0002】L-リジンは、必須アミノ酸として蛋白質中にその存在が知られ、医薬や食品添加物として用いられている。

【0003】

【従来の技術】従来、L-リジンの工業的製造法としては、グルタミン生産菌であるコリネ型細菌の各種栄養要求株、各種薬剤耐性株、各種薬剤感受性株を用いてL-リジンを製造する方法が知られている【例えば、特公昭51-21078号公報、特公昭53-1833号公報、特公昭62-8692号公報等参照】。また、組換え菌を用いた製造法も提案されている【特開昭56-160997号公報、特開昭60-62994号公報、特開昭62-79788号公報等参照】。しかしながら、従来提案されている方法によるL-リジンの製造法では、対糖収率が低く及び/又はL-リジンの蓄積に限界があり、新たな観点から、遺伝子工学的手法による菌株の改良等を含め、L-リジンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0004】一方、アスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 [Journal of Biological Chemistry, 256, p 10228~p 10230, 1981参照] がよく研究されている。また、グラム陽性細菌由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) としては、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 等が知られている [Journal of Biological Chemistry, 262, p 8787~p 8798, 1987; Molecular Microbiology, 5, p 1197~p 1204, 1991参照]。しかしながら、プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子については従来の報告例は見当たらない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点から効率的にL-リジンを製造することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌染色体よりアスパルトキナーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を

形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、効率的にL-リジンを製造しうることを見出し本発明を完成するに至った。

【0007】かくして本発明によれば、

(1) コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;

(2) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド;

(3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌;及び

(4) 該形質転換されたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてL-リジンを製造する方法が提供される。

【0008】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0009】本発明の「アスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA」とは、L-アスパラギン酸にリン酸を付加する酵素、すなわちアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNAを意味するものである。

【0010】アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (以下、これを「A断片」と略称することがある) は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常はアスパルトキナーゼ生産性微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌、殊にプレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0011】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである:A断片は、上記コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0012】まず、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。

【0013】得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399 (宝酒造製) に挿入し、このベクターを用いて、アスパルトキナーゼ遺伝子が欠損した大腸菌 (エシェリヒア・コリ) 変異株CGSC5074 [エシェリヒア・コリ ジエネテック・ストック センター (*Escherichia coli* Genetic Stock Center)、デパートメントオブバイオロジー、エールユニバーシティ (Department of Biology, Yale University); P.O. Box 6666 New Haven, CT 06511-744, U.S.A. 保存菌株] を形質転換し、選択培地に塗抹すること

により、形質転換株を取得する。

【0014】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0015】かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを、通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により、前記アスパルトキナーゼが欠損した大腸菌変異株に導入し、選択培地に塗抹する。

【0016】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプ

レバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0017】このようにして得られるA断片の一つは、上記プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素NruIで切断することによって得られる大きさが約1.7 kbのDNA断片を挙げることができる。

【0018】この約1.7 kbのアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。

【0019】

【表1】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Dra I	1	0.2, 1.5
Hinc II	2	0.3, 0.6, 0.7
Hind III	1	0.4, 1.2

なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0020】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (ϕ x 174 phage) のDNAを制限酵素Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1 kbから1 kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0021】一方、上記のプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素NruI-EcoRIによって切断することにより得られる大きさが

約1.7 kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製)を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法、Sanger, F. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p 5463, 1977)により決定することができる。このようにして決定した上記約1.7 kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したアスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、以下に示す配列を有するものであり、421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対から構成されている。

【0022】

【化3】上記の塩基配列を包含する本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製 System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0023】また、前記の如くプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、アスパルトキナーゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0024】以上に詳述した大きさが約1.7 kbのDNA断片の制限酵素による切断点地図を図1に示す。

【0025】本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）は、適当なプラスミド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でアスパルトキナーゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0026】また、本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、アスパルトキナーゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0027】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0028】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0029】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、ブレヴィバクテリウム・スタチオニス（*Brevibacterium stationis*）IFO12144（FERM BP-2515）からプラスミドpBY503（このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照）DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0 kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1 kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出

す。これらの両断片をプラスミドpHSG298（宝酒造製）のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0030】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0031】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。

【0032】このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約1.7 kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、L-リジンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-AKと命名した。プラスミドpCRY30-AKの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0033】このようにして造成されるアスパルトキナーゼ遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-リジンを安定に効率よく生産することが可能となる。

【0034】本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233（FERM BP-1497）、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41（FERM BP-1498）、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11（FERM BP-1500）、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21（FERM BP-1499）等が挙げられる。

【0035】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性微生物である（特公昭59-28398号公報第3～4欄参照）。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である（特開昭62-51998号公報参照）。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である（特開昭61-177993号公報参照）。

【0036】これらの微生物の他に、プレバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagens*) ATCC 6871、同ATCC 13745、同ATCC 13746；プレバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020；プレバクテリウム・ラクトファーメントム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869；コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0037】なお、宿主としてプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502（特開昭63-36787号公報参照）のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0038】宿主プレバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ（濃度：0.2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）もしくはエチジウムブロミド（濃度：0.2~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）等を含む培地に、1ml当たり約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0039】このようにして得られるプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように [Calvin, N.M. and Hanawalt, P.C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988) ; Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌へのパルス波通電 [Satoh, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照] によりプラスミドを導入することが可能である。

【0040】上記の方法で形質転換して得られるアスパルターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。

【0041】培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通

常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、蔗糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイプリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0042】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20~約40℃、好ましくは約25℃~約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5~10、好ましくは7~8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。

【0043】培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1~5容量%、更に好ましくは2~3容量%である。また、培養期間は通常1~7日間とすることができ、最適期間は3日間である。

【0044】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-リジン生成反応に使用することができる。

【0045】L-リジン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破砕物、さらにそれから分離回収した粗酵素又は精製酵素として、あるいはそれらを適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破砕物や粗または精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0046】しかして本発明に従えば、グルコースを、上記培養菌体又は菌体処理物と接触させて、L-リジンを生成せしめることからなるL-リジンの製造法が提供される。

【0047】グルコースと上記培養菌体又は菌体処理物との接触は、通常の酵素反応と同様に、水性媒体中において、好ましくは約20~約40℃、特に約25~約35℃において行なうことができる。

【0048】生成するL-リジンは例えば、高速液体クロマトグラフィー等の手段により反応液から分離回収することができる。

【0049】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

【0050】実施例1

プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）のクローン化

(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 MgSO_4 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 MnSO_4 4~6 H_2O 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 μg 、塩酸チアミン200 μg 、グルコース20g、蒸留水1l〕1lに、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mM トリス緩衝液 (pH 8.0) -1mM EDTA-2Na 溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この容菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 \times g、20分間、10~12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mM トリス緩衝液 (pH 7.5) -1mM EDTA-2Na 溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0051】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液の90 μl を制限酵素EcoRI 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI分解DNAにクローニングベクターpHSG399 (宝酒造より市販) を制限酵素EcoRIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 及びT₄DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0052】(C) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選抜に用いたアスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株は、エシェリヒア・コリCGSC 5074

(thr A1101, lys C1001, met L1000) である〔()内はアスパルトキナーゼ遺伝子型 (Genotype) を示す〕。上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリCGSC 5074株を形質転換し、クロラムフェニコール50mgを含む選択培地 [K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1

g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0053】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約3.8kbの挿入DNA断片が認められた。

【0054】本プラスミドをpHSG399-AKと命名した。

【0055】(D) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (A) 断片のサブクローニング
上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC119 (宝酒造より市販) へアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0056】上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKを制限酵素EcoRI、NruIで切断したものと、プラスミドpUC119を制限酵素EcoRI、SmaIで切断したものを混合し、50mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 及びT₄DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合させた。

【0057】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリCGSC 5074株を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地 [K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0058】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpUC119の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約1.7kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約1.7kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0059】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

【0060】

【表2】

表2 プラスミドpUC119-AK

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	4.9
Bgl II	2	4.2, 0.6
Hind III	2	3.6, 1.2

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpUC119-AKと命名した。

【0061】以上によりアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む大きさが約1.7 kbのDNA断片(EcoRI-BamHI断片)を得ることができた。

【0062】実施例2

アスパルトキナーゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例1の(D)項で得られたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む長さが約1.7 kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119(宝酒造製)を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法)(Sahger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977)により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0063】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、下記配列に示す塩基配列を有する421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対より構成されていることが判明した。

【0064】

【化4】

実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレビパクテリウム・スタチオニスIFO12144(FERM BP-2515)から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。半合成培地A培地[尿素2g、(NH₄)₂SO₄ 7g、K₂HPO₄ 0.5g、KH₂PO₄ 0.5g、MgSO₄ 0.5g、FeSO₄・7H₂O 6mg、MnSO₄・4~6H₂O 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピチオン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g及び蒸留水1l]1lに、プレビパクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液[25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、10mMのEDTA、50mMグルコース]20m

lに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液[0.2N NaOH、1%(W/V)SDS]40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液[5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、蒸留水28.5mlの混合液]30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0065】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。

【0066】これに等量のフェノール-クロロホルム液(フェノール:クロロホルム=1:1混和液)を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0067】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液[トリス10mM、EDTA 1mM; HClにてpH8.0に調整]2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液[5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液]15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000×gの遠心分離を行った。

【0068】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見出しされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。

【0069】次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50μg得た。

【0070】(B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298(宝酒造製)0.5μgに制限酵素SalI(5units)を37℃1時間反応させ、

プラスミドDNAを完全に分解した。

【0071】前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2 μ gに制限酵素XhoI(1unit)を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4 DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル(宝酒造製)を形質転換した。

【0072】形質転換株は30 μ g/ml(最終濃度)のカナマイシン、100 μ g/ml(最終濃度)のIPTG(イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド)100 μ g/ml(最終濃度)のX-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド)を含むL培地(トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1l、pH7.2)で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法[T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook, "Molecular cloning"(1982)p90~91参照]により抽出した。

【0073】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。

【0074】次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0075】実施例4

プラスミドpCRY30-AKの作成及びコリネ型細菌への導入

実施例1の(C)項で得られたプラスミドpHSG39-AK 5 μ gを制限酵素EcoRI-NruIを各5units 用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、BamHIリンカー(宝酒造より市販)1 μ lを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0076】このDNAを制限酵素BamHI 3unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1 μ gを制限酵素BamHI 1unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、カナマイシン50 μ g/mlを含む選択培地[K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄·7H₂O 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0077】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、長さ1.7kbの挿入DNA断片が認められた。

【0078】上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0079】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。

【0080】プレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのパルス用溶液(272mM Sucrose、7mM KH₂PO₄、1mM MgCl₂; pH7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlのパルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50 μ lとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンパルサー(バイオラド社製)を用いて、2500ボルト、25 μ FDに設定し、パルスを印加後水中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15 μ g/ml(最終濃度)を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

【0081】

【表3】

表3 プラスミドpCRY30-AK

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
EcoRI	2	8.6, 1.7
BamHI	1	10.4

上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AKと命名した。

【0082】なお、プラスミドpCRY30-AKにより形質転換されたプレビバクテリウム・フラバムMJ233-AKは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成3年12月16日付で：微工研菌寄第12658号（FERM P-12658）として寄託されている。

【0083】実施例5

プラスミドpCRY30-AKの安定性

前記のA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換株プレビバクテリウム・フラバムMJ233-AKを接種し、30℃にて24時間振盪培養を行った後、同様にして調製したA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したものに、1ml当たり50cellsの割合になるように接種し、同じく30℃にて24時間振盪培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを15μg/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントした。

【0084】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらにA培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

【0085】実施例6

L-リジンの生産

培地（尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、KH₂PO₄ 0.05%、K₂HPO₄ 0.05%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、CaCl₂・2H₂O 2ppm、FeSO₄・7H₂O 2ppm、MnSO₄・4~6H₂O 2ppm、ZnSO₄・7H₂O 2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl 100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）100mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌（滅菌後pH7.0）した後プレビバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flavum*）MJ233-AK（FERM P-12658号）を接種し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0086】次に、本培養培地（グルコース5%、硫酸アンモニウム2.3%、KH₂PO₄ 0.05%、K₂HPO₄ 0.05%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、FeSO₄・7H₂O 20ppm、MnSO₄・4~6H₂O 20ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl 100μg/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%）の1000mlを2l容通気攪拌槽に仕込み、滅菌（120℃、20分間）後、前記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間培養を行った。

【0087】培養終了後、培養物500mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液[(NH₄)₂SO₄ 2g/l; KH₂PO₄ 0.5g/l; K₂HPO₄ 0.5g/l; MgSO₄・7H₂O 0.5g/l; FeSO₄・7H₂O 20ppm; MnSO₄・4~6H₂O 20ppm; チアミン塩酸塩100μg/l; pH7.6]の1000mlに懸濁後、該懸濁液を2l容通気攪拌槽に仕込み、グルコース9gを添加して、回転数300rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間反応を行った。

【0088】反応終了後、遠心分離（4000rpm、15分間、4℃）にて除菌した上清液中のL-リジンを定量した。その結果、上清液中のL-リジン生成量は、1.5g/lであった。

【0089】この反応終了後の培養液500mlを、強酸性陽イオン交換樹脂（H⁺型）のカラムに通してL-リジンを吸着させ、水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出させた後、L-リジン画分を濃縮し、冷エタノールでL-リジンの結晶を析出させた。その結果、400mgのL-リジン結晶を得た。

【0090】また、比較例として、同様の条件にて、プレビバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flavum*）MJ-233（FERM BP-1497）を培養し、同様の条件にて反応させた後上清液中のL-リジンを定量した。その結果、上清液中のL-リジン生成量は0.6g/lであった。

【0091】

【化5】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の制限酵素による切断点地図。

【図2】大きさが約1.7kbの本発明DNA断片の塩

基配列決定のための概略図。

【化2その1】

Val	Ala	Leu	Val	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Val	Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala
			20					25					30		
Gly	Asn	Asn	Val	Val	Val	Val	Cys	Ser	Ala	Met	Gly	Asp	Thr	Thr	Asp
			35				40					45			
Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Arg
			50				55					60			
Glu	Met	Asp	Met	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu
65					70					75					80
Val	Ala	Met	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr
					85					90				95	
Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Thr	Glu	Arg	His	Gly	Asn	Ala	Arg
			100						105					110	
Ile	Val	Asp	Val	Thr	Pro	Gly	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Leu	Asp	Glu	Gly
			115						120					125	
Lys	Ile	Cys	Ile	Val	Ala	Gly	Phe	Gln	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg
			130					135					140		
Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Val	Ala
145						150					155				160

【化2その2】

Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Ala	Asp	Val	Cys	Glu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Val
				165					170					175	
Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala	Asp	Pro	Arg	Ile	Val	Pro	Asn	Ala	Gln	Lys
			175					180					185		
Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly
		190				195					200				
Ser	Lys	Ile	Leu	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Ala	Phe	Asn
	205				210						215				
Val	Pro	Leu	Arg	Val	Arg	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Leu
220				225					230				235		
Ile	Ala	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Thr
			240					245					250		
Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile
		255					260						265		
Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Lys	Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp
	270					275						280			
Ala	Glu	Ile	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu
	285					290						295			
Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr	Cys	Pro	Arg	Ser	Asp	Gly	Arg
300					305					310				315	

【化2その3】

【配列】

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1 5 10 15
GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
20 25 30
GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
35 40 45
GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
50 55 60
GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
65 70 75 80
GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
85 90 95
GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC

【化3その2】

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg			
100	105	110	
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC			
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly			
115	120	125	
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC			
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg			
130	135	140	
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA			
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala			
145	150	155	160
TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT			
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val			
165	170	175	
GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG			
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys			
175	180	185	
CTG GAA AAG CTC ACC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC			

【化3その3】

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 190 195 200
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 205 210 215
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 220 225 230 235
 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA CCA GTC CTT ACC
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 240 245 250
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 255 260 265
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 270 275 280
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 285 290 295

【化3その4】

GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg

300 305 310 315

CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr

320 325 330

AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala

335 340 345

GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu

350 355 360

CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TOC ACC TCT GAG ATC CGC

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg

365 370 375

ATT TOC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA

Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala

380 385 390 400

CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT

【化3その5】

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr

405 410 415

GCA GGC ACC GGA CGC

Ala Gly Thr Gly Arg

420

【化4その1】

[配列]

GTG	GCC	CTG	GTC	GTA	CAG	AAA	TAT	GGC	GGT	TCC	TCG	CTT	GAG	AGT	GCG
Val	Ala	Leu	Val	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala
1				5					10					15	
GAA	CGC	ATT	AGA	AAC	GTC	GCT	GAA	CGG	ATC	GTT	GCC	ACC	AAG	AAG	GCT
Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Val	Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala
				20					25					30	
GGA	AAT	AAT	GTC	GTG	GTT	GTC	TGC	TCC	GCA	ATG	GGA	GAC	ACC	ACG	GAT
Gly	Asn	Asn	Val	Val	Val	Val	Cys	Ser	Ala	Met	Gly	Asp	Thr	Thr	Asp
				35					40					45	
GAG	CTT	CTA	GAA	CTT	GCT	GCG	GCA	GTG	AAT	CCC	GTT	CCG	CCA	GCT	CGT
Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Arg
				50					55					60	
GAA	ATG	GAT	ATG	CTC	CTG	ACT	GCT	GGT	GAG	CGT	ATT	TCT	AAC	GCT	CTC
Glu	Met	Asp	Met	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu
				65					70					75	
GTC	GCC	ATG	GCT	ATT	GAG	TCC	CTG	GGT	GCA	GAG	GCT	CAA	TCT	TTC	ACG
Val	Ala	Met	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr
									85					90	
															95
GGT	TCT	CAG	GCT	GGT	GTG	CTC	ACC	ACC	GAG	CGT	CAC	GGA	AAC	GCA	GCG

【化4その2】

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg			
100	105	110	
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC			
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly			
115	120	125	
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC			
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg			
130	135	140	
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA			
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala			
145	150	155	160
TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT			
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val			
165	170	175	
GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG			
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys			
175	180	185	
CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC			
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly			
190	195	200	

【化4その3】

TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn

205 210 215

GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu

220 225 230 235

ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT OCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr

240 245 250

GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile

255 260 265

TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT
Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp

270 275 280

GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu

285 290 295

GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC OCT CGC TCT GAC GCA CGC

【化4その4】

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg			
300	305	310	315
CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC			
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr			
	320	325	330
AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG			
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala			
	335	340	345
GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG			
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu			
	350	355	360
CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC			
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg			
	365	370	375
ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA			
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala			
	380	385	390
CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT			
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr			
	405	410	415

【化4その5】

【化5その1】

GCA GGC ACC GGA CGC

Ala Gly Thr Gly Arg

420

配列番号 : 1

配列の長さ : 1263

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : プレビバクテリウム フラバム

株名 : MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号 : peptide

存在位置 : 1-1263

特徴を決定した方法 : P

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG

Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala

1 5 10 15

GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CCG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala

20 25 30

【化5その2】

GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT
 Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp

35 40 45

GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg

50 55 60

GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu

65 70 75 80

GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr

85 90 95

GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg

100 105 110

ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly

115 120 125

AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC

【化5その3】

Lys	Ile	Cys	Ile	Val	Ala	Gly	Phe	Gln	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg
130						135						140			
GAT	GTC	ACC	ACG	TTG	GGT	CGC	GGT	GGT	TCT	GAT	ACC	ACT	GCA	GTT	GCA
Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Val	Ala
145						150						155			160
TTG	GCA	GCT	GCT	CTG	AAC	GCT	GAT	GTG	TGT	GAG	ATT	TAC	TCA	GAT	GTT
Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Ala	Asp	Val	Cys	Glu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Val
						165						170			175
GAC	GGC	GTG	TAC	ACC	GCT	GAC	CCG	CGC	ATC	GTT	CCT	AAT	GCT	CAG	AAG
Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala	Asp	Pro	Arg	Ile	Val	Pro	Asn	Ala	Gln	Lys
						175						180			185
CTG	GAA	AAG	CTC	AGC	TTC	GAA	GAA	ATG	CTG	GAA	CTT	GCT	GCT	GTT	GGC
Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly
						190						195			200
TCC	AAG	ATT	TTG	GTG	CTA	CGC	AGT	GTT	GAA	TAC	GCT	CGT	GCA	TTC	AAT
Ser	Lys	Ile	Leu	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Ala	Phe	Asn
						205						210			215
GTG	CCA	CTT	CGC	GTA	CGC	TCG	TCT	TAT	AGC	AAT	GAT	CCC	GGC	ACT	TTG
Val	Pro	Leu	Arg	Val	Arg	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Leu
220						225						230			235

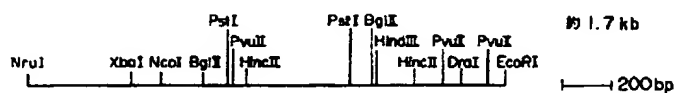
【化5その4】

ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 240 245 250
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 255 260 265
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 270 275 280
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 285 290 295
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 300 305 310 315
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 320 325 330
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG

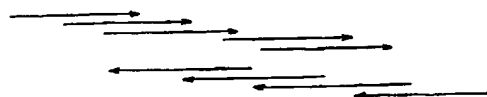
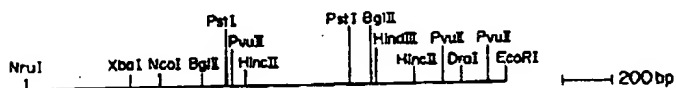
【化5その5】

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 335 340 345
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 350 355 360
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 365 370 375
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 380 385 390 400
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
 GCA GGC ACC GGA CGC
 Ala Gly Thr Gly Arg
 420

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(72)発明者 湯川 英明
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三
菱油化株式会社筑波総合研究所内

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-184366

(43)公開日 平成5年(1993)7月27日

(51)Int.Cl.⁵

C12N 15/00

識別記号

庁内整理番号

A 8931-4B

FI

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数8(全27頁)

(21)出願番号

特願平4-24658

(22)出願日

平成4年(1992)1月14日

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 谷野 信剛

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 久留主 泰朗

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA及びその利用

(57)【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233からアスパルトキナーゼをコードするDNAを単離し、この遺伝子の塩基配列を決定した。

【効果】 このアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株は、L-リジンの生成量が増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 コリネ型細菌がプレビバクテリウム・フ

ラバム (Brevibacterium flavum) MJ 233である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

【化1】

```
GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCTGGCTTG AGAGTGGGA ACCGATTAGA 60
AACGTCGCTG AACGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGGAA ATAATGTCGT GGTTCCTGCG 120
TCGCAATGG GAGACACCAC GGATGAGCTT CTAGAACTTG CTGCGGCAGT GAATCCCGTT 180
CCGCCAGCTC GTGAAATGGA TATGCTCTG ACTGCTGCTG ACCGTATTTC TAACGCTCTC 240
GTGCCATGG CTATTGAGTC CCTGGGTGCA GAGGCTCAAT CTTTCACGGG TTCTCAGGCT 300
GGTGTGCTCA CCACCGAGCG TCACGGAAC GCACGCATTG TTGATGTCAC TCCAGGTCGT 360
GTGGCTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCATTGTTG CTGCTTTCCA GGGTGTCAAT 420
AAGGAAACCC GCGATGTCAC CACGTTGGGT CGCGGTGGTT CTGATACCAC TGCAGTTGCA 480
TTGGCAGCTG CTCTGAACCC TGATGTGTGT GAGATTACT CAGATGTTGA CGGCGTGTC 540
ACCGCTGACC CGCGCATCGT TCCTAATGCT CAGAAGCTGG AAAAGCTCAG CTTCGAAGAA 600
ATGCTGGAAC TTGCTGCTGT TGGCTCCAAG ATTTTGGTGC TACCCAGTGT TGAATACGCT 660
CGTGCAATCA ATGTGCCACT TCGGTACGC TCGTCTTATA GCAATGATCC CGGCACCTTG 720
ATTGCCGGCT CTATGGAGGA TATTCCTGTG GAAGAAGCAG TCCTTACCGG TGTGCAACC 780
GACAAGTCG AAGCCAAAGT AACCGTTCTG GGTATTTCCG ATAAGCCAGG CGAGGCTGCG 840
AAGGTTTTCC GTGCGTTGGC TGATGCAGAA ATCAACATTG ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900
TCCTCTGTGG AAGACGGCAC CACGACATC ACGTTCACCT GCCCTCGCTC TGACGGACGC 960
CGTGGATGG AGATCTTGAA GAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGCTTTAC 1020
GACGACCAGG TCGCCAAAGT CTCCCTCGTG GGTGCGGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080
ACCGCAGAGT TCATGGAAGC TCTGCGGAT GTCAACGTGA ACATCGAATT GATTTCACC 1140
TCTGAGATCC GCATTTCCTG CTGATCCGT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGCACGTGCA 1200
CTGCATGAGC AGTTCCAGCT GGGCGCGGAA GACGAAGCCG TCGTTTATGC AGGCACCGGA 1260
CCC
```

で示されるアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

【化2】で示されるアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子

を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【請求項8】 グルコースを、請求項7記載のコリネ型細菌の培養菌体又は菌体処理物と接触させてL-リジンを生成せしめることを特徴とするL-リジンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アスパルトキナーゼ

(E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子を含むコリネ型細菌由来の遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、及び該コリネ型細菌を用いるL-リジンの製造法に関する。

【0002】L-リジンは、必須アミノ酸として蛋白質中にその存在が知られ、医薬や食品添加物として用いられている。

【0003】

【従来の技術】従来、L-リジンの工業的製造法としては、グルタミン生産菌であるコリネ型細菌の各種栄養要求株、各種薬剤耐性株、各種薬剤感受性株を用いてL-リジンを製造する方法が知られている【例えば、特公昭51-21078号公報、特公昭53-1833号公報、特公昭62-8692号公報等参照】。また、組換え菌を用いた製造法も提案されている【特開昭56-160997号公報、特開昭60-62994号公報、特開昭62-79788号公報等参照】。しかしながら、従来提案されている方法によるL-リジンの製造法では、対糖収率が低く及び/又はL-リジンの蓄積に限界があり、新たな観点から、遺伝子工学的手法による菌株の改良等を含め、L-リジンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0004】一方、アスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 [Journal of Biological Chemistry, 256, p 10228~p 10230, 1981参照] がよく研究されている。また、グラム陽性細菌由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) としては、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 等が知られている [Journal of Biological Chemistry, 262, p 8787~p 8798, 1987; Molecular Microbiology, 5, p 1197~p 1204, 1991参照]。しかしながら、プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子については従来の報告例は見当たらない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点から効率的にL-リジンを製造することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌染色体よりアスパルトキナーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を

形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、効率的にL-リジンを製造しうることを見出し本発明を完成するに至った。

【0007】かくして本発明によれば、

(1) コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA;

(2) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド;

(3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌;及び

(4) 該形質転換されたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてL-リジンを製造する方法が提供される。

【0008】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0009】本発明の「アスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA」とは、L-アスパラギン酸にリン酸を付加する酵素、すなわちアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNAを意味するものである。

【0010】アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (以下、これを「A断片」と略称することがある) は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常はアスパルトキナーゼ生産性微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌、殊にプレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0011】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである:A断片は、上記コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0012】先ず、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。

【0013】得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399 (宝酒造製) に挿入し、このベクターを用いて、アスパルトキナーゼ遺伝子が欠損した大腸菌 (エシェリヒア・コリ) 変異株CGSC5074 [エシェリヒア・コリ ジエネテック・ストック センター (*Escherichia coli* Genetic Stock Center)、デパートメントオブバイオロジー、エールユニバーシティ (Department of Biology, Yale University); P.O. Box 6666 New Haven, CT 06511-744, U.S.A. 保存菌株] を形質転換し、選択培地に塗抹すること

により、形質転換株を取得する。

【0014】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたブレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0015】かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを、通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により、前記アスパルトキナーゼが欠損した大腸菌変異株に導入し、選択培地に塗抹する。

【0016】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたブ

レバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0017】このようにして得られるA断片の一つは、上記ブレバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素NruIで切断することによって得られる大きさが約1.7kbのDNA断片を挙げることができる。

【0018】この約1.7kbのアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。

【0019】

【表1】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Dra I	1	0.2、1.5
Hinc II	2	0.3、0.6、0.7
Hind III	1	0.4、1.2

なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0020】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ(λ phage)のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ(φ x 174 phage)のDNAを制限酵素Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1kbから1kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0021】一方、上記のブレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素NruI-EcoRIによって切断することにより得られる大きさが

約1.7kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119(宝酒造製)を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxynucleic acid termination 法、Sanger, F. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p 5463, 1977)により決定することができる。このようにして決定した上記約1.7kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したアスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、以下に示す配列を有するものであり、421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対から構成されている。

【0022】

【化3】上記の塩基配列を包含する本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベクマン社製 System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0023】また、前記の如くブレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、アスパルトキナーゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0024】以上に詳述した大きさが約1.7kbのDNA断片の制限酵素による切断点地図を図1に示す。

【0025】本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）は、適当なプラスミド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でアスパルトキナーゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0026】また、本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、アスパルトキナーゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0027】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0028】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0029】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレビバクテリウム・スタチオニス（*Brevibacterium stationis*）IFO12144（FERM BP-2515）からプラスミドpBY503（このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照）DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出

す。これらの両断片をプラスミドpHSG298（宝酒造製）のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0030】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0031】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。

【0032】このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約1.7kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、L-リジンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-AKと命名した。プラスミドpCRY30-AKの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0033】このようにして造成されるアスパルトキナーゼ遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-リジンを安定に効率よく生産することが可能となる。

【0034】本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233（FERM BP-1497）、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41（FERM BP-1498）、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11（FERM BP-1500）、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21（FERM BP-1499）等が挙げられる。

【0035】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性微生物である（特公昭59-28398号公報第3〜4欄参照）。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である（特開昭62-51998号公報参照）。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である（特開昭61-177993号公報参照）。

【0036】これらの微生物の他に、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagense*) ATCC 6871、同ATCC 13745、同ATCC 13746；プレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020；プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869；コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0037】なお、宿主としてプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502（特開昭63-36787号公報参照）のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である[Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0038】宿主プレビバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ（濃度：0.2~50 μ g/ml）もしくはエチジウムブロミド（濃度：0.2~50 μ g/ml）等を含む培地に、1ml当たり約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0039】このようにして得られるプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように[Calvin, N.M. and Hanawalt, P.C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988) ; Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌へのパルス波通電[Sato, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照]によりプラスミドを導入することが可能である。

【0040】上記の方法で形質転換して得られるアスパルターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。

【0041】培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通

常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、蔗糖等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸二水素カリウム、リン酸三水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0042】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20~約40℃、好ましくは約25℃~約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5~10、好ましくは7~8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。

【0043】培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1~5容量%、更に好ましくは2~3容量%である。また、培養期間は通常1~7日間とすることができ、最速期間は3日間である。

【0044】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-リジン生成反応に使用することができる。

【0045】L-リジン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破砕物、さらにそれから分離回収した粗酵素又は精製酵素として、あるいはそれらを適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破砕物や粗または精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0046】しかし本発明に従えば、グルコースを、上記培養菌体又は菌体処理物と接触させて、L-リジンを生成せしめることからなるL-リジンの製造法が提供される。

【0047】グルコースと上記培養菌体又は菌体処理物との接触は、通常の酵素反応と同様に、水性媒体中において、好ましくは約20~約40℃、特に約25~約35℃において行なうことができる。

【0048】生成するL-リジンは例えば、高速液体クロマトグラフィー等の手段により反応液から分離回収することができる。

【0049】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

【0050】実施例1

プレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来のアスパルターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）のクローン化

(A) プレビバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 MgSO_4 0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6 mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6 mg、酵母エキス2.5 g、カザミノ酸5 g、ビオチン200 μg 、塩酸チアミン200 μg 、グルコース20 g、蒸留水1 l〕1 lに、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10 mg/mlの濃度にリゾチームを含む10 mM NaCl-20 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) -1 mM EDTA-2 Na 溶液15 mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この容菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 \times g、20分間、10~12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) -1 mM EDTA-2 Na 溶液5 mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0051】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液の90 μl を制限酵素EcoRI 50 unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI分解DNAにクローニングベクターpHSG399 (宝酒造より市販)を制限酵素EcoRIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl_2 及びT₄ DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0052】(C) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選抜に用いたアスパルトキナーゼ欠損大腸菌変異株は、エシェリヒア・コリCGSC 5074

(thr A1101, lys C1001, met L1000) である〔()内はアスパルトキナーゼ遺伝子型 (Genotype) を示す〕。上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリCGSC 5074株を形質転換し、クロラムフェニコール50 mgを含む選択培地 [K_2HPO_4 7 g、 KH_2PO_4 2 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1

g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、グルコース20 g及び寒天16 gを蒸留水1 lに溶解]に塗抹した。

【0053】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2 kbのDNA断片に加え、長さ約3.8 kbの挿入DNA断片が認められた。

【0054】本プラスミドをpHSG399-AKと命名した。

【0055】(D) アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (A) 断片のサブクローニング
上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC119 (宝酒造より市販)へアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0056】上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKを制限酵素EcoRI、NruIで切断したものと、プラスミドpUC119を制限酵素EcoRI、SmaIで切断したものを混合し、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl_2 及びT₄ DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合させた。

【0057】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により前記エシェリヒア・コリCGSC 5074株を形質転換し、アンピシリン50 mgを含む選択培地 [K_2HPO_4 7 g、 KH_2PO_4 2 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、グルコース20 g及び寒天16 gを蒸留水1 lに溶解]に塗抹した。

【0058】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpUC119の長さ3.2 kbのDNA断片に加え、長さ約1.7 kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約1.7 kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0059】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

【0060】

【表2】

表2 プラスミドpUC119-AK

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamH I	1	4.9
Bgl II	2	4.2, 0.6
Hind III	2	3.6, 1.2

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpUC119-AKと命名した。

【0061】以上によりアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む大きさが約1.7kbのDNA断片(EcoRI-BamHI断片)を得ることができた。

【0062】実施例2

アスパルトキナーゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例1の(D)項で得られたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む長さが約1.7kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119(宝酒造製)を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法)(Sahger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977)により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0063】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、下記配列に示す塩基配列を有する421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対より構成されていることが判明した。

【0064】

【化4】

実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレビパクリウム・スタチオニスIFO12144(FERM BP-2515)から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。半合成培地A培地[尿素2g、(NH₄)₂SO₄ 7g、K₂HPO₄ 0.5g、KH₂PO₄ 0.5g、MgSO₄ 0.5g、FeSO₄·7H₂O 6mg、MnSO₄·4~6H₂O 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピチオン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g及び蒸留水11]11に、プレビパクリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液[25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、10mMのEDTA、50mMグルコース]20m

lに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液[0.2N NaOH、1% (W/V) SDS]40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液[5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、蒸留水28.5mlの混合液]30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0065】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。

【0066】これに等量のフェノール-クロロホルム液(フェノール:クロロホルム=1:1混和液)を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0067】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液[トリス10mM、EDTA 1mM; HClにてpH8.0に調整]2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液[5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液]15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000×gの遠心分離を行った。

【0068】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見出される。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。

【0069】次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50μg得た。

【0070】(B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298(宝酒造製)0.5μgに制限酵素SalI(5units)を37℃1時間反応させ、

プラスミドDNAを完全に分解した。

【0071】前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2 μ gに制限酵素XhoI(1unit)を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4 DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル(宝酒造製)を形質転換した。

【0072】形質転換株は30 μ g/ml(最終濃度)のカナマイシン、100 μ g/ml(最終濃度)のIPTG(イソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド)100 μ g/ml(最終濃度)のX-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルー β -D-ガラクトピラノシド)を含むL培地(トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1l、pH7.2)で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法[T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook, "Molecular cloning"(1982)p90~91参照]により抽出した。

【0073】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。

【0074】次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0075】実施例4

プラスミドpCRY30-AKの作成及びコリネ型細菌への導入

実施例1の(C)項で得られたプラスミドpHSG39-AK 5 μ gを制限酵素EcoRI-NruIを各5units 用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、BamHIリンカー(宝酒造より市販)1 μ lを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0076】このDNAを制限酵素BamHI 3unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1 μ gを制限酵素BamHI 1unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、カナマイシン50 μ g/mlを含む選択培地[K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄·7H₂O 0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0077】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ1.7kbの挿入DNA断片が認められた。

【0078】上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0079】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。

【0080】プレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地对数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのバルス用溶液(272mM Sucrose、7mM KH₂PO₄、1mM MgCl₂; pH7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlのバルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50 μ lとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンパルサー(バイオラド社製)を用いて、2500ボルト、25 μ FDに設定し、パルスを印加後水中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15 μ g/ml(最終濃度)を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

【0081】

【表3】

表3 プラスミドpCRY30-AK

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
EcoRI	2	8.6, 1.7
BamHI	1	10.4

上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-AKと命名した。

【0082】なお、プラスミドpCRY30-AKにより形質転換されたブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233-AKは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成3年12月16日付で：微工研菌寄第12658号（FERM P-12658）として寄託されている。

【0083】実施例5

プラスミドpCRY30-AKの安定性

前記のA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換株ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ233-AKを植菌し、30℃にて24時間振盪培養を行った後、同様にして調製したA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したものに、1ml当たり50cellsの割合になるように植菌し、同じく30℃にて24時間振盪培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを15μg/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントした。

【0084】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらにA培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

【0085】実施例6

L-リジンの生産

培地（尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、KH₂PO₄ 0.05%、K₂HPO₄ 0.05%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、CaCl₂・2H₂O 2ppm、FeSO₄・7H₂O 2ppm、MnSO₄・4~6H₂O 2ppm、ZnSO₄・7H₂O 2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl 100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%）100mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌（滅菌後pH7.0）した後ブレヴィバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flavum*）MJ233-AK（FERM P-12658号）を植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0086】次に、本培養培地（グルコース5%、硫酸アンモニウム2.3%、KH₂PO₄ 0.05%、K₂HPO₄ 0.05%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、FeSO₄・7H₂O 20ppm、MnSO₄・4~6H₂O 20ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl 100μg/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%）の1000mlを2l容通気攪拌槽に仕込み、滅菌（120℃、20分間）後、前記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間培養を行った。

【0087】培養終了後、培養物500mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液[(NH₄)₂SO₄ 2g/l; KH₂PO₄ 0.5g/l; KH₂PO₄ 0.5g/l; MgSO₄・7H₂O 0.5g/l; FeSO₄・7H₂O 20ppm; MnSO₄・4~6H₂O 20ppm; チアミン塩酸塩100μg/l; pH7.6]の1000mlに懸濁後、該懸濁液を2l容通気攪拌槽に仕込み、グルコース9gを添加して、回転数300rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間反応を行った。

【0088】反応終了後、遠心分離（4000rpm、15分間、4℃）にて除菌した上清液中のL-リジンを定量した。その結果、上清液中のL-リジン生成量は、1.5g/lであった。

【0089】この反応終了後の培養液500mlを、強酸性陽イオン交換樹脂（H⁺型）のカラムに通してL-リジンを吸着させ、水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出させた後、L-リジン画分を濃縮し、冷エタノールでL-リジンの結晶を析出させた。その結果、400mgのL-リジン結晶を得た。

【0090】また、比較例として、同様の条件にて、ブレヴィバクテリウム・フラバム（*Brevibacterium flavum*）MJ-233（FERM BP-1497）を培養し、同様の条件にて反応させた後上清液中のL-リジンを定量した。その結果、上清液中のL-リジン生成量は0.6g/lであった。

【0091】

【化5】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の制限酵素による切断点地図。

【図2】大きさが約1.7kbの本発明DNA断片の塩

基配列決定のための概略図。

【化2その1】

Val	Ala	Leu	Val	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Val	Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala
			20					25					30		
Gly	Asn	Asn	Val	Val	Val	Val	Cys	Ser	Ala	Met	Gly	Asp	Thr	Thr	Asp
			35				40					45			
Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Arg
			50				55				60				
Glu	Met	Asp	Met	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu
65					70					75				80	
Val	Ala	Met	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr
					85					90				95	
Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Thr	Glu	Arg	His	Gly	Asn	Ala	Arg
			100						105					110	
Ile	Val	Asp	Val	Thr	Pro	Gly	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Leu	Asp	Glu	Gly
			115				120						125		
Lys	Ile	Cys	Ile	Val	Ala	Gly	Phe	Gln	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg
			130				135					140			
Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Val	Ala
145					150					155				160	

【化2その2】

Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Ala	Asp	Val	Cys	Glu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Val
				165				170						175	
Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala	Asp	Pro	Arg	Ile	Val	Pro	Asn	Ala	Gln	Lys
				175				180						185	
Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly
				190				195						200	
Ser	Lys	Ile	Leu	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Ala	Phe	Asn
				205				210						215	
Val	Pro	Leu	Arg	Val	Arg	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Leu
				220				225						230	
Ile	Ala	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Thr
								240						245	
Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile
								255						260	
Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Lys	Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp
								270						275	
Ala	Glu	Ile	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu
								285						290	
Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr	Cys	Pro	Arg	Ser	Asp	Gly	Arg
								300						305	
														310	
															315

【化2その3】

【配列】

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG											
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala											
1	5	10	15								
GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT CAA CCG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT											
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala											
20	25	30									
GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT											
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp											
35	40	45									
GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT											
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg											
50	55	60									
GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC											
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu											
65	70	75	80								
GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG											
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr											
85	90	95									
GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC											

【化3その2】

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg			
100	105	110	
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC			
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly			
115	120	125	
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC			
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg			
130	135	140	
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA			
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala			
145	150	155	160
TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT			
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val			
165	170	175	
GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG			
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys			
175	180	185	
CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC			

【化3その3】

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly

190

195

200

TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn

205

210

215

GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu

220

225

230

235

ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC

Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr

240

245

250

GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT

Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile

255

260

265

TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT

Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp

270

275

280

GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA

Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu

285

290

295

【化3その4】

GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg

300 305 310 315

CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr

320 325 330

AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala

335 340 345

GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu

350 355 360

CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TOC ACC TCT GAG ATC CGC

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg

365 370 375

ATT TOC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA

Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala

380 385 390 400

CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT

【化3その5】

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr

405 410 415

GCA GGC ACC GGA CGC

Ala Gly Thr Gly Arg

420

【化4その1】

[配列]

GTG	GCC	CTG	GTC	GTA	CAG	AAA	TAT	GGC	GGT	TCC	TCG	CTT	GAG	AGT	GCG
Val	Ala	Leu	Val	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala
1					5					10					15
GAA	CGC	ATT	AGA	AAC	GTC	GCT	GAA	CGG	ATC	GTT	GCC	ACC	AAG	AAG	GCT
Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Val	Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala
					20					25					30
GGA	AAT	AAT	GTC	GTG	GTT	GTC	TGC	TCC	GCA	ATG	GGA	GAC	ACC	ACG	GAT
Gly	Asn	Asn	Val	Val	Val	Val	Cys	Ser	Ala	Met	Gly	Asp	Thr	Thr	Asp
					35					40					45
GAG	CTT	CTA	GAA	CTT	GCT	GCG	GCA	GTG	AAT	CCC	GTT	CCG	CCA	GCT	CGT
Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Arg
					50					55					60
GAA	ATG	GAT	ATG	CTC	CTG	ACT	GCT	GGT	GAG	CGT	ATT	TCT	AAC	GCT	CTC
Glu	Met	Asp	Met	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu
					65					70					75
GTC	GCC	ATG	GCT	ATT	GAG	TCC	CTG	GGT	GCA	GAG	GCT	CAA	TCT	TTC	ACG
Val	Ala	Met	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr
										85					90
GGT	TCT	CAG	GCT	GGT	GTG	CTC	ACC	ACC	GAG	CGT	CAC	GGA	AAC	GCA	CGC
															95

【化4その2】

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg			
100	105	110	
ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC			
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly			
115	120	125	
AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC			
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg			
130	135	140	
GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA			
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala			
145	150	155	160
TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT			
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val			
165	170	175	
GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG			
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys			
175	180	185	
CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC			
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly			
190	195	200	

【化4その3】

TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn

205 210 215

GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu

220 225 230 235

ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr

240 245 250

GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile

255 260 265

TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp

270 275 280

GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu

285 290 295

GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC

【化4その4】

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 300 305 310 315
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 320 325 330
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 335 340 345
 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 350 355 360
 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 365 370 375
 ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 380 385 390 400
 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415

【化4その5】

【化5その1】

GCA GGC ACC GGA CGC

Ala Gly Thr Gly Arg

420

配列番号 : 1

配列の長さ : 1263

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : プレバクテリウム フラバム

株名 : MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号 : peptide

存在位置 : 1-1263

特徴を決定した方法 : P

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG

Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala

1 5 10 15

GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala

20 25 30

【化5その2】

GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT
 Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp

35 40 45

GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg

50 55 60

GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu

65 70 75 80

GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr

85 90 95

GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC CCA CGC
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg

100 105 110

ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly

115 120 125

AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC

【化5その3】

Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 130 135 140
 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160
 TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT
 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 175 180 185
 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 190 195 200
 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 205 210 215
 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 220 225 230 235

【化5その4】

ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 240 245 250
 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GGC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 255 260 265
 TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT
 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 270 275 280
 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 285 290 295
 GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA GGC
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
 300 305 310 315
 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 320 325 330
 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG

【化5その5】

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala

335

340

345

GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu

350

355

360

CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg

365

370

375

ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA

Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala

380

385

390

400

CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr

405

410

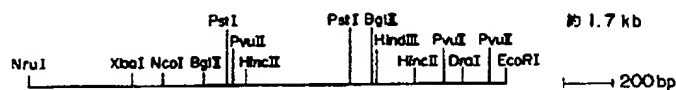
415

GCA GGC ACC GGA CGC

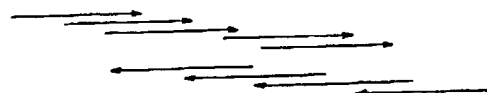
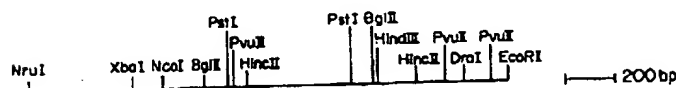
Ala Gly Thr Gly Arg

420

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三
菱油化株式会社筑波総合研究所内